

Aus der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Direktor: Prof. Dr. H. P. Wolff

**Untersuchungen über Auswirkungen der Beladung
von Erythrozyten mit 1-Bromomercuri-2-hydroxy-
propan (BMHP) und N-Äthylmaleinsäureimid (NÄM)
auf die osmotische Resistenz und die Erythrozyten-
morphologie.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Erhard Tussing
aus Neuruppin

Mainz 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554425_0104

Aus der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Direktor: Prof. Dr. H. P. Wolff

Untersuchungen über Auswirkungen der Beladung
von Erythrozyten mit 1-Bromomercuri-2-hydroxy-
propan (BMHP) und N-Äthylmaleinsäureimid (NÄM)
auf die osmotische Resistenz und die Erythrozyten-
morphologie.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Erhard Tussing
aus Neuruppin

Mainz 1971

Dekan: Professor Dr.med.Dr.med.dent. W. Ketterl

Referent: Professor Dr.med. J. Fischer

Korreferent: Professor Dr.med. H.P. Wolff

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1971

Inhaltsverzeichnis:

I.	Einleitung	1
II.	Methodik	
	A. Die osmotische Resistenz	5
	B. Die Price-Jones Kurve	9
	C. Statistische Berechnungen	10
III.	Ergebnisse	
	A. Die osmotische Resistenz	32
	B. Die Price-Jones Kurve	45
IV.	Diskussion	58
V.	Zusammenfassung	66
	Lebenslauf	



I. E I N L E I T U N G

Radioaktive Isotope zählen heute in der Diagnostik der Hämatologie zur Standardausrüstung moderner Laboratorien. Sie werden routinemäßig eingesetzt zur Bestimmung des Plasma- und Blutvolumens, der Erythrozyten- und Thrombozytenlebenszeit, der Ferrokinetik sowie der Resorption von Vitamin B₁₂.

In Kenntnis der Funktion der Milz als Erythrozytensequestrationsorgan benutzt man künstlich geschädigte Erythrozyten als Träger des radioaktiven Indikators. Diese Erythrozytenschädigung gelingt mit serologischen, physikalischen und chemischen Methoden.

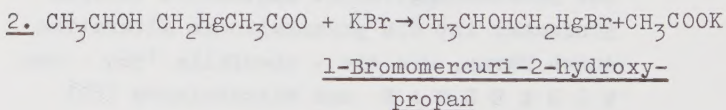
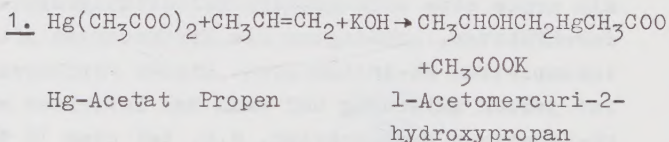
J O H N S O N und Mitarbeiter (14), die 1960 als erste eine erfolgreiche Milzszintigraphie durchführten, schädigten die Erythrozyten mit inkompletten Rh-Antikörpern. Dieses Verfahren ist jedoch aufwendig und kann bei Patienten mit rh-negativen Erythrozyten, d.h. bei etwa 15 % der Bevölkerung, nicht angewendet werden. Einfacher ist die physikalische Alteration durch Wärme, wie sie - ebenfalls 1960 - von W I N K E L M A N und Mitarbeitern (33) angegeben wurde.

1963 konnte die Aufbereitungszeit durch chemische Alteration weiter verkürzt werden. Als Substanzen wurden 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP) und N-Äthylmaleinsäureimid (NÄM) benutzt.

F I S C H E R (8) und W A G N E R (30) wurden zur Verwendung des BMHP durch eine Arbeit von K E S S L E R, L O Z A N O und P I T T S (15) angeregt. Diese Autoren entdeckten zufällig eine ungewöhnlich hohe Milzspeicherung des 1-Jodomercuri-2-hydroxypropan (IMHP), einer Substanz, die im Jahre 1900 erstmals von S A N D und H O F M A N N (24) synthetisiert wurde.

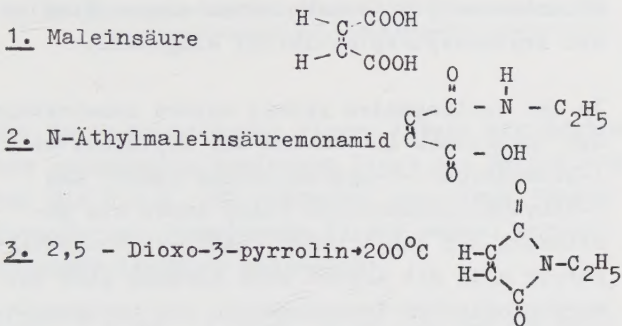
BMHP - eine organische Quecksilberverbindung ohne diuretische Wirkung - wird inzwischen mit Erfolg bei der Milzszintigraphie angewendet. Es ermöglicht eine schnelle Schädigung des Erythrozyten und seine gleichzeitige radioaktive Markierung durch das Radioisotop ^{197}Hg .

Das Schema der BMHP - Synthese lautet:



N-Äthylmaleinsäureimid (NÄM), das als weitere Substanz zur chemischen Alteration von W A G N E R und Mitarbeitern (31) sowie von S M Y T H und Mitarbeitern (25) verwendet wurde, synthetisierte erstmals G I U S T I N I N I im Jahre 1896.

Das Schema der NAM - Synthese lautet:



N-Äthylmaleinsäureimid

Durch die genannte serologische, physikalische oder chemische Schädigung kommt es zu einem Plastizitätsverlust der Erythrozyten. Unter Plastizität oder Fluidität - einem biophysikalischen Merkmal - versteht man die Fähigkeit zur reversiblen Verformung des Erythrozyten. Die Zelle kann ihre bikonkave Scheibenform beim Durchtritt durch das perisinusale Maschenwerk der Milzpulpa so weitgehend verändern, daß sie auch durch Öffnungen hindurchgelangen, deren Durchmesser kleiner sind als ihr eigener. Beim Verlust der Plastizität - physiologischerweise bei der Zellalterung-, pathologischerweise durch Schädigung des Zellinhaltes oder der Zellmembran - ist der Erythrozyt zu einer nennenswerten Verformung nicht mehr fähig. Er bleibt im retikulären Maschenwerk der Milz hängen; er wird sequestriert.

J U N G (13), N I C O L A U, T E I T E L und
F O T I N O (19,20,29) sowie J A N D L und
Mitarbeiter (12) bearbeiteten dieses Problem
der Erythrozytenplastizität eingehend.

In der vorliegenden Arbeit wurden Auswirkungen
der chemischen Alteration der Erythrozyten mit
1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP) und
N-Äthylmaleinsäureimid (NÄM) durch die Be-
stimmung der osmotischen Resistenz untersucht.
Ferner soll die Arbeit eine Aussage über die
morphologischen Veränderungen der Erythrozyten
ermöglichen.

II. M E T H O D I S C H E S V O R G E H E N

A. Die osmotische Blutkörperchenresistenz

=====

Der Versuchsanordnung dieser Arbeit zur Bestimmung der osmotischen Resistenz liegt die Empfehlung von D A C I E (4) zugrunde. Aus einer 1%igen gepufferten Stammlösung (siehe unten) werden folgende Lösungen angesetzt:

0,1% - 0,3% - 0,375% - 0,4% - 0,45% - 0,5% - 0,55%
- 0,6% - 0,8% .

Zur Stammlösung werden folgende Chemikalien angesetzt:

NaCl	90,00 g
Na ₂ HPO ₄ + 2H ₂ O	17,11 g
NaH ₂ PO ₄ + 2H ₂ O	2,43 g

Diese Chemikalien werden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst. (10 ml der 1,0%igen Stammlösung auf 100 ml destilliertes Wasser ergibt die 0,1%ige Lösung etc.)

Zur Aufbereitung des zu untersuchenden Blutes erfolgt die Entnahme von 8 ml venösem Blut, das dann mit 2 ml ACD versetzt wird. Dieser Stabilisator (Firma Braun, Melsungen) hat folgende Zusammensetzung:

Natr. citric.	26,6 g
H ₂ O	5,5 g
Acid. citric.	6,6 g
Glucose	22,0 g
Aqua bidest.	ad 100,0 ml

Die so erhaltene Blutmenge wird mit 10 ml kalter physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt, sehr vorsichtig umgeschüttelt, um eine mechanische Haemolyse möglichst zu vermeiden und anschließend 2 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand (Serum und physiologische NaCl-Lösung) wird abpipettiert.

Nach 3maligem Waschen der Erythrozyten wird

a) die äquivalente Menge 0,9%iger NaCl-Lösung in Relation zu den verbliebenen Erythrozyten hinzugefügt, und zwar zur Bestimmung der nicht alterierten Erythrozyten,

b) werden die Erythrozyten des gleichen Probanden zur Bestimmung der osmotischen Resistenz nach Alteration mit 2 verschiedenen Konzentrationen sowohl von 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP) als auch von N-Äthylmaleinsäureimid (NAM) versetzt

Es wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Konzentrationen verwendet:

1 ml Erythrozyten+1mg BMHP(ca.3,0 μ Mol)= 1/1 BMHP

1 ml Erythrozyten+0,5mg " (ca.1,5 μ Mol)= 1/0,5 "

1 ml Erythrozyten+1 mg NÄM(ca.8,0 μ Mol)= 1/1 NÄM

1 ml Erythrozyten+0,5mg " (ca.4,0 μ Mol)= 1/0,5 "

*)

Da BMHP im sauren pH-Bereich ausfällt, erfolgt ein Zusatz von NaOH, um in dem Bereich von pH = 10,0 eine vollständige Lösung zu erreichen. NÄM dagegen hat eine gute Löslichkeit bei einem pH = 5, so daß weitere Zusätze entfallen können.

Um die osmotische Resistenz zu bestimmen, werden 9 Röhrchen mit je 5 ml der oben genannten 9 verschiedenen prozentigen, gepufferten Lösung beschickt. Dazu werden pro Versuchsreihe je 0,05 ml der nicht-alterierten bzw. 0,05 ml der durch die beiden chemischen Substanzen alterierten Erythrozyten hinzugefügt. Diese so erhaltenen Gemische von Erythrozytensuspensionen mit BMHP bzw. NÄM werden 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wird dieser Ansatz 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Zur photometrischen Messung (576 m μ) der eingetretenen Haemolyse wird nur der Überstand des zentrifugierten Gemisches verwandt.

*) Die o.g. Konzentrationen von BMHP bzw. NÄM werden in den nachfolgenden Untersuchungen verwendet:

1/1 BMHP - 1/0,5 BMHP
1/1 NÄM - 1/0,5 NÄM

Als Leerwert dient bei der Bestimmung der osmotischen Resistenz (ohne Inkubation) der abgelesene Wert der 0,8%igen NaCl-Lösung.

Der Wert des Überstandes der 0,1%igen Lösung entspricht 100 % Haemolyse.

In der Arbeit von B E Y E R (3) lag schon im Leerwert eine geringfügige Haemolyse vor; hier soll kontrolliert werden, ob alleine durch die Alteration mit den verschiedenen Konzentrationen von BMHP oder NÄM eine solche Hämolyse im Leerwert auftritt.

Zu dieser Beweisführung wird die oben beschriebene Versuchsanordnung in der Weise abgeändert, daß als Leerwert die 0,8%ige NaCl-Lösung der nicht-alterierten Kontrollreihe im Beckmann-Photometer abgelesen wird. Wäre schon durch die chemische Alteration eine geringgradige Hämolyse hervorgerufen, würde sie in der bisher durchgeführten Versuchsanordnung nicht berücksichtigt, da hier als Leerwert die 0,8%ige NaCl-Lösung der jeweilig zugehörigen Versuchsreihe gilt.

B. Die Price-Jones Kurve

=====

Um über eine Änderung der Form und des Durchmessers der Erythrozyten durch die Alteration mit BMHP bzw. NÄM eine Aussage machen zu können, werden vor und nach der Alteration bei o.g. Konzentrationen dünne Blutausstriche angefertigt und nach der Pappenheim'schen Methode gefärbt. Von jedem dieser Blutausstriche werden dann unter Zuhilfenahme eines Okularmikrometers je 200 einzeln gelegene Erythrozyten ausgemessen. Bei der Einteilung des Okularmikrometers entsprach

1 Teilstrich = 1,25 μ .

Aufschlüsse über die Errechnung des mittleren Durchmessers der Erythrozyten und ihre statistische Verteilungskurve wurde von Price Jones eingeführt und läßt die Häufigkeit von Makro-, Normo- und Mikrozyten erkennen.

Die Breite der glockenförmigen Kurvenbasis ist ein Maß für die Stärke der Anisozytose. Eine nach rechts verlagerte Kurve deutet auf eine Makro- bzw. Megalozytose hin, wie sie z.B. gehäuft bei der Perniciosa vorgefunden wird. Dagegen läßt eine linksverschobene Kurve eine Mikrozytose erkennen - wie z.B. bei der haemolytischen Anämie.

Diese durch die Alteration mit BMHP und NÄM ausgelösten Volumenschwankungen wurden mit Hilfe der Price-Jones Kurve erfaßt und graphisch dargestellt.

C. Statistische Berechnungen

=====

Da unsere Untersuchungen hinsichtlich ihrer Exaktheit auf Grund mehrerer unkontrollierbarer Einflüsse nicht beliebig oft reproduzierbar waren, mußten die Ergebnisse mit Hilfe statistischer Auswertungsmethoden gesichert werden. (5,16,17)

Wir haben uns zunächst den möglichen Veränderungen der osmotischen Resistenz zugewandt und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ü B E R L A diese Ergebnisse mit dem

t - Test bei paarweiser Anordnung geprüft.

Dies war gerechtfertigt, da die 3 Kurven der osmotischen Resistenz für n i c h t a l t e r i e r t e und mit den beiden chemischen Substanzen a l t e r i e r t e n Erythrozyten im gleichen Experiment bei einem Probanden zur selben Zeit vorgenommen wurden.

Dieses Vorgehen der paarweisen Anordnung ist effizienter, da die Streuung sich auf die Differenzzunahmen beziehen, die die Streuung zwischen den jeweils 10 verschiedenen Probanden vermindern.

Die Werte unserer beiden Meßreihen von a l t e r i e r t und n i c h t a l t e r i e r t e n Erythrozyten sind x_1 und x_2 . (Tabelle 1-6) (S.12-17)

x_1 und x_2 sind diejenigen Werte (= x-%ige NaCl-Lösung), bei denen bei alterierten (x_1) bzw. nicht alterierten (x_2) Erythrozyten eine Hämolyse von 25,50 bzw. 75% auftritt.

*Mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Ü B E R L A - Institut für medizinische Statistik und Dokumentation, Universität Mainz - war es möglich, statistische Kennwerte zu berechnen um somit eine Aussage über die Erythrozytenalterationen und morphologische Veränderungen an dem einzelnen Erythrozyten machen zu können.

OSMOTISCHE RESISTENZ

t - Test bei paarweiser Anordnung

Berechnung für Versuche mit B M H P

a) bei 25 % Hämolyse

<u>$x_1 = 1/1$ BMHP</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,46	= 0,48	= + 0,02
2. = 0,41	= 0,41	= 0,0
3. = 0,48	= 0,47	= - 0,01
4. = 0,45	= 0,45	= 0,0
5. = 0,41	= 0,43	= + 0,02
6. = 0,43	= 0,44	= + 0,01
7. = 0,43	= 0,45	= + 0,02
8. = 0,47	= 0,47	= 0,0
9. = 0,49	= 0,48	= - 0,01
10. = 0,41	= 0,42	= + 0,01

Ergebnis: t = + 1,76

<u>$x_1 = 1/0,5$ BMHP</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,45	= 0,48	= + 0,03
2. = 0,44	= 0,41	= - 0,03
3. = 0,46	= 0,47	= + 0,01
4. = 0,45	= 0,45	= 0,0
5. = 0,42	= 0,43	= + 0,01
6. = 0,45	= 0,44	= - 0,01
7. = 0,44	= 0,45	= + 0,01
8. = 0,48	= 0,47	= - 0,01
9. = 0,50	= 0,48	= - 0,02
10. = 0,45	= 0,42	= - 0,03

Ergebnis: t = + 0,64

OSMOTISCHE RESISTENZ

t - Test bei paarweiser Anordnung

Berechnung für Versuche mit B M H P

b) bei 50 % Hämolyse

<u>$x_1 = 1/1$</u>	<u>BMHP</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1.	= 0,42	= 0,43	= + 0,01
2.	= 0,35	= 0,36	= + 0,01
3.	= 0,45	= 0,46	= + 0,01
4.	= 0,44	= 0,43	= - 0,01
5.	= 0,37	= 0,39	= + 0,02
6.	= 0,41	= 0,42	= + 0,01
7.	= 0,41	= 0,44	= + 0,03
8.	= 0,43	= 0,44	= + 0,01
9.	= 0,46	= 0,46	= 0,0
10.	= 0,40	= 0,39	= - 0,01

Ergebnis: t = + 2,05

<u>$x_1 = 1/0,5$</u>	<u>BMHP</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1.	= 0,41	= 0,43	= + 0,02
2.	= 0,40	= 0,36	= - 0,04
3.	= 0,43	= 0,46	= + 0,03
4.	= 0,43	= 0,43	= 0,0
5.	= 0,37	= 0,39	= + 0,02
6.	= 0,42	= 0,42	= 0,0
7.	= 0,42	= 0,44	= + 0,02
8.	= 0,45	= 0,44	= - 0,01
9.	= 0,47	= 0,46	= - 0,01
10.	= 0,40	= 0,39	= - 0,01

Ergebnis: t = + 0,37

OSMOTISCHE RESISTENZ

t - Test bei paarweiser Anordnung

Berechnung für Versuche mit B M H P

c) bei 75 % Hämolyse

=====

<u>$x_1 = 1/1$ BMHP</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,36	= 0,38	= + 0,02
2. = 0,27	= 0,28	= + 0,01
3. = 0,42	= 0,43	= + 0,01
4. = 0,42	= 0,41	= - 0,01
5. = 0,30	= 0,34	= + 0,04
6. = 0,39	= 0,38	= - 0,01
7. = 0,38	= 0,41	= + 0,03
8. = 0,40	= 0,40	= 0,0
9. = 0,43	= 0,44	= + 0,01
10. = 0,38	= 0,36	= - 0,02

Ergebnis: t = + 1,35

<u>$x_1 = 1/0,5$ BMHP</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,35	= 0,38	= + 0,03
2. = 0,33	= 0,28	= - 0,05
3. = 0,41	= 0,43	= + 0,02
4. = 0,41	= 0,41	= 0,0
5. = 0,32	= 0,34	= + 0,02
6. = 0,37	= 0,38	= + 0,01
7. = 0,39	= 0,41	= + 0,02
8. = 0,42	= 0,40	= - 0,02
9. = 0,45	= 0,44	= - 0,01
0. = 0,37	= 0,36	= - 0,01

Ergebnis: t = + 0,13

OSMOTISCHE RESISTENZ

t - Test bei paarweiser Anordnung

Berechnung für Versuche mit NÄM

a) bei 25 % Hämolyse

<u>$x_1 = 1/1$ NÄM</u>	<u>$x_2 =$ nicht alteriert</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,39	= 0,46	= + 0,07
2. = 0,46	= 0,47	= + 0,01
3. = 0,30	= 0,44	= + 0,14
4. = 0,43	= 0,50	= + 0,07
5. = 0,49	= 0,48	= - 0,01
6. = 0,29	= 0,42	= + 0,13
7. = 0,40	= 0,51	= + 0,11
8. = 0,43	= 0,46	= + 0,03
9. = 0,42	= 0,49	= + 0,07
10. = 0,40	= 0,48	= + 0,08

Ergebnis: $t = + 4,40$

<u>$x_1 = 1/0,5$ NÄM</u>	<u>$x_2 =$ nicht alteriert</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,40	= 0,46	= + 0,06
2. = 0,46	= 0,47	= + 0,01
3. = 0,33	= 0,44	= + 0,11
4. = 0,46	= 0,50	= + 0,04
5. = 0,47	= 0,48	= + 0,01
6. = 0,41	= 0,42	= + 0,01
7. = 0,45	= 0,51	= + 0,06
8. = 0,44	= 0,46	= + 0,02
9. = 0,45	= 0,49	= + 0,04
10. = 0,44	= 0,48	= + 0,04

Ergebnis: $t = + 4,00$

O S M O T I S C H E R E S I S T E N Z

t - Test bei paarweiser Anordnung

Berechnung für Versuche mit NÄM

b) bei 50 % Hämolyse

<u>$x_1 = 1/1$ NÄM</u>	<u>$x_2 =$ nicht alteriert</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,37	= 0,43	= + 0,06
2. = 0,44	= 0,45	= + 0,01
3. = 0,28	= 0,40	= + 0,12
4. = 0,39	= 0,48	= + 0,09
5. = 0,48	= 0,47	= - 0,01
6. = 0,27	= 0,39	= + 0,12
7. = 0,33	= 0,44	= + 0,11
8. = 0,41	= 0,43	= + 0,02
9. = 0,36	= 0,44	= + 0,08
10. = 0,37	= 0,46	= + 0,09

Ergebnis: $t = + 5,30$

<u>$x_1 = 1/0,5$ NÄM</u>	<u>$x_2 =$ nicht alteriert</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,38	= 0,43	= + 0,05
2. = 0,44	= 0,45	= + 0,01
3. = 0,30	= 0,40	= + 0,10
4. = 0,42	= 0,48	= + 0,06
5. = 0,45	= 0,47	= + 0,02
6. = 0,39	= 0,39	= 0,0
7. = 0,38	= 0,44	= + 0,06
8. = 0,42	= 0,43	= + 0,01
9. = 0,40	= 0,44	= + 0,04
10. = 0,41	= 0,46	= + 0,05

Ergebnis: $t = + 4,10$

OSMOTISCHE RESISTENZ

t - Test bei paarweiser Anordnung

Berechnung für Versuche mit NÄM

c) bei 75 % Hämolyse

<u>$x_1 = 1/1$ NÄM</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,35	= 0,41	= + 0,06
2. = 0,42	= 0,43	= + 0,01
3. = 0,25	= 0,34	= + 0,09
4. = 0,36	= 0,46	= + 0,10
5. = 0,45	= 0,44	= - 0,01
6. = 0,26	= 0,36	= + 0,10
7. = 0,28	= 0,39	= + 0,11
8. = 0,39	= 0,41	= + 0,02
9. = 0,29	= 0,40	= + 0,11
10. = 0,36	= 0,44	= + 0,08

Ergebnis: $t = + 5,10$

<u>$x_1 = 1/0,5$ NÄM</u>	<u>$x_2 = \text{nicht alteriert}$</u>	<u>$d = x_2 - x_1$</u>
1. = 0,35	= 0,41	= + 0,06
2. = 0,42	= 0,43	= + 0,01
3. = 0,27	= 0,34	= + 0,07
4. = 0,39	= 0,46	= + 0,07
5. = 0,43	= 0,44	= + 0,01
6. = 0,38	= 0,36	= - 0,02
7. = 0,28	= 0,39	= + 0,11
8. = 0,40	= 0,41	= + 0,01
9. = 0,36	= 0,40	= + 0,04
10. = 0,38	= 0,44	= + 0,06

Ergebnis: $t = + 3,50$

Zur Prüfung der Paardifferenzen d_i dient der Quotient aus dem Mittelwert der n Differenzen ($\bar{d}$) und der zugehörigen Standardabweichungen ($s_{\bar{d}}$) mit $n - 1$ Freiheitsgraden. (n = Anzahl der Paardifferenzen). Den Berechnungen für den t-Test bei paarweiser Anordnung und $n - 1 = 9$ Freiheitsgraden liegt folgende Formel zu Grunde:

$$\begin{array}{ll}
 \underline{1} & \Sigma d \\
 \underline{2} & \bar{d} = \frac{\Sigma d}{n} \\
 \underline{3} & d^2 \\
 \underline{4} & \frac{(\Sigma d)^2}{n} \\
 \underline{5} & s_{dd} = 3-4 = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} \\
 \underline{6} & s_{\bar{d}} = \sqrt{\frac{s_{dd}}{n (n-1)}} \\
 \underline{7} & t = \frac{\bar{d}}{s_{\bar{d}}}
 \end{array}$$

Aus den Kurven der osmotischen Resistenz von nicht alterierten und mit BMHP bzw. NÄM alterierten Erythrozyten wurden diejenigen NaCl-Konzentrationen (X) ermittelt, die zu einer Haemolyse von 25%, 50% und 75% führten.

Um der Möglichkeit zu begegnen, bei der auf 10 Probanden begrenzten Anzahl von Untersuchungen zufällig ein signifikantes Ergebnis zu erhalten, wurde die Bestimmung der Irrtumswahrscheinlichkeit bei einem Niveau von $P < 0,01$ bzw. $P < 0,001$ zugrunde gelegt.

Die morphologischen Veränderungen am einzelnen Erythrozyten, die durch die o.g. Alteration hervorgerufen wurden, ließen sich durch den Vergleich der Price-Jones Kurven verdeutlichen.

Die Price-Jones Kurve als Erythrozytenverteilungskurve beschreibt eine weitgehende symmetrische glockenförmige Funktion.

In Tabelle 7 und 8 (S. 21-22) sind je 10 identische Probanden aufgeführt, bei denen - in einzelnen Erythrozytendurchmessergruppen ($5,00 \mu$ bis $11,25 \mu$) ausgezählt - je 200 Erythrozyten vor und nach der o.g. Alteration mit BMHP bzw. NÄM gemessen wurden.

Zu einer statistischen Aussage bei der Price-Jones Kurve wurde berechnet:

a) Mittelwert ($\bar{x}$), Varianz (s^2) und Streuung (s)

für jeden Probanden bei BMHP und NÄM

(nach Documenta Geigy, S. 161)

(siehe Tabelle 9 und 10). (S. 23-24).

$$1: \quad \bar{x} = \bar{x}' + d \frac{\sum fz}{N}$$

$$2: \quad s^2 = \frac{d^2}{N-1} \cdot \left[\sum (fz^2) - \frac{(\sum fz)^2}{N} \right]$$

$$3: \quad s = \sqrt{s^2}$$

Es sind für jeden Probanden die Klassen (Gruppen) $x_1, x_2, \dots, x_n$ mit der für alle Klassen gleichen Klassenbreite $d = x_{i+1} - x_i$ (1,25 μ) gegeben.

Diese sind mit den Frequenzen $f_1, f_2, \dots, f_n$ ($N = \sum f_i$) besetzt. Dann wird ein vorläufiger Mittelwert $\bar{x}'$ gewählt, der auf eine Klasse fällt. Nun werden die Klassen nummeriert. $\bar{x}'$ erhält die Nummer $z = 0$, absteigend erhalten die Klassen die Nummer $z = -1, -2, \dots$, aufsteigend die Nummer $z = +1, +2, \dots$.

Für jeden Versuch wurden 200 Erythrozyten ($N = 200$) ausgezählt.

P R I C E - J O N E S K U R V E N

Werte der Durchmesser von je 200 Erythrozyten

Versuche mit B M H P

	μ	<u>5,00</u>	<u>6,25</u>	<u>7,50</u>	<u>8,75</u>	<u>10,00</u>	<u>11,25</u>
<u>nicht alteriert</u>							
1. Flor	0	24	146	30	0	0	
2. Schönborn	0	34	137	29	0	0	
3. Schöche	0	39	142	19	0	0	
4. Wagner	0	19	158	23	0	0	
5. Pfeiffer	0	25	145	30	0	0	
6. Hegel	0	28	147	25	0	0	
7. Koch	0	21	145	34	0	0	
8. Nikolay	0	14	148	38	0	0	
9. Fischer	0	12	124	52	12	0	
10. Weimann	0	31	139	30	0	0	

1/1 B M H P

1.	2	40	112	40	6	0	
2.	0	9	105	60	25	1	
3.	0	30	130	35	5	0	
4.	0	14	140	41	5	0	
5.	0	9	130	58	3	0	
6.	0	20	114	52	14	0	
7.	0	30	134	30	6	0	
8.	0	25	120	48	7	0	
9.	0.	13	102	81	4	0	
10.	0	10	113	62	15	0	

1/0,5 B M H P

1.	0	52	129	18	1	0	
2.	0	27	129	41	3	0	
3.	0	61	116	22	1	0	
4.	0	32	145	23	0	0	
5.	0	39	125	33	3	0	
6.	0	30	131	36	3	0	
7.	0	24	141	34	1	0	
8.	0	29	129	38	4	0	
9.	0	12	137	45	6	0	
10.	0	23	126	43	8	0	

Die Zeichnung der P R I C E - J O N E S K U R V E N bezieht sich auf die Einheit 100 !

P R I C E - J O N E S K U R V E

Werte der Durchmesser von je 200 Erythrozyten

Versuche mit N Ä M

	μ	<u>5,00</u>	<u>6,25</u>	<u>7,50</u>	<u>8,75</u>	<u>10,00</u>	<u>11,25</u>
<u>nicht alteriert</u>							
1. Knorr	0	15	144	31	10	0	
2. Silz	0	35	130	33	2	0	
3. Usadel	0	20	130	44	6	0	
4. Carlino	0	19	150	30	1	0	
5. Korn	0	15	126	54	5	0	
6. Fischer	0	12	124	52	12	0	
7. Weimann	0	31	139	30	0	0	
8. Bredmer	0	18	128	49	5	0	
9. Frey	0	32	144	23	1	0	
10. Möller	0	30	122	44	4	0	

1/1 N Ä M

1.	5	35	121	34	5	0	
2.	0	10	119	60	11	0	
3.	0	40	81	65	14	0	
4.	0	13	114	67	6	0	
5.	0	19	82	80	19	0	
6.	0	24	140	33	3	0	
7.	0	45	113	37	5	0	
8.	0	26	112	52	8	2	
9.	0	29	122	41	8	0	
10.	3	34	120	40	3	0	

1/0,5 N Ä M

1.	0	7	134	57	2	0	
2.	0	12	139	44	5	0	
3.	0	10	85	82	20	3	
4.	0	13	105	72	10	0	
5.	0	4	73	95	26	2	
6.	0	1	82	98	19	0	
7.	0	16	94	83	7	0	
8.	0	15	85	75	25	0	
9.	0	10	92	69	24	5	
10.	0	25	90	70	13	2	

Die Zeichnung der P R I C E - J O N E S K U R V E N bezieht sich auf die Einheit 100 !

Mittelwert ($\bar{x}$), Varianz (s^2), Streuung (s)

Berechnung für Versuche mit B M H P

nicht alteriert

1.	$\bar{x} = 6,91$	$s^2 = 0,42$	$s = 0,65$
2.	$\bar{x} = 6,84$	$s^2 = 0,49$	$s = 0,70$
3.	$\bar{x} = 6,75$	$s^2 = 0,44$	$s = 0,66$
4.	$\bar{x} = 6,90$	$s^2 = 0,33$	$s = 0,57$
5.	$\bar{x} = 7,00$	$s^2 = 0,43$	$s = 0,65$
6.	$\bar{x} = 6,86$	$s^2 = 0,42$	$s = 0,64$
7.	$\bar{x} = 6,96$	$s^2 = 0,43$	$s = 0,65$
8.	$\bar{x} = 7,03$	$s^2 = 0,39$	$s = 0,62$
9.	$\bar{x} = 7,28$	$s^2 = 0,72$	$s = 0,85$
10.	$\bar{x} = 6,87$	$s^2 = 0,47$	$s = 0,68$

1/1 B M H P

1.	$\bar{x} = 6,92$	$s^2 = 0,88$	$s = 0,93$
2.	$\bar{x} = 7,50$	$s^2 = 0,97$	$s = 0,98$
3.	$\bar{x} = 6,97$	$s^2 = 0,66$	$s = 0,81$
4.	$\bar{x} = 7,11$	$s^2 = 0,53$	$s = 0,73$
5.	$\bar{x} = 7,22$	$s^2 = 0,50$	$s = 0,70$
6.	$\bar{x} = 7,25$	$s^2 = 0,86$	$s = 0,93$
7.	$\bar{x} = 6,95$	$s^2 = 0,65$	$s = 0,81$
8.	$\bar{x} = 7,11$	$s^2 = 0,74$	$s = 0,86$
9.	$\bar{x} = 7,35$	$s^2 = 0,62$	$s = 0,78$
10.	$\bar{x} = 7,39$	$s^2 = 0,77$	$s = 0,87$

1/0,5 B M H P

1.	$\bar{x} = 6,68$	$s^2 = 0,53$	$s = 0,73$
2.	$\bar{x} = 7,00$	$s^2 = 0,61$	$s = 0,78$
3.	$\bar{x} = 6,65$	$s^2 = 0,63$	$s = 0,79$
4.	$\bar{x} = 6,82$	$s^2 = 0,42$	$s = 0,65$
5.	$\bar{x} = 6,88$	$s^2 = 0,66$	$s = 0,81$
6.	$\bar{x} = 6,95$	$s^2 = 0,61$	$s = 0,78$
7.	$\bar{x} = 6,94$	$s^2 = 0,48$	$s = 0,69$
8.	$\bar{x} = 6,98$	$s^2 = 0,64$	$s = 0,80$
9.	$\bar{x} = 7,16$	$s^2 = 0,55$	$s = 0,74$
10.	$\bar{x} = 7,10$	$s^2 = 0,70$	$s = 0,84$

Mittelwert ($\bar{x}$), Varianz (s^2), Streuung (s)

Berechnung für Versuche mit N Ä M

nicht alteriert

1.	$\bar{x} = 6,94$	$s^2 = 0,31$	$s = 0,56$
2.	$\bar{x} = 6,89$	$s^2 = 0,59$	$s = 0,77$
3.	$\bar{x} = 7,10$	$s^2 = 0,64$	$s = 0,80$
4.	$\bar{x} = 6,96$	$s^2 = 0,41$	$s = 0,64$
5.	$\bar{x} = 7,18$	$s^2 = 0,59$	$s = 0,77$
6.	$\bar{x} = 7,28$	$s^2 = 0,70$	$s = 0,84$
7.	$\bar{x} = 6,87$	$s^2 = 0,48$	$s = 0,69$
8.	$\bar{x} = 7,13$	$s^2 = 0,61$	$s = 0,78$
9.	$\bar{x} = 6,83$	$s^2 = 0,45$	$s = 0,67$
10.	$\bar{x} = 7,01$	$s^2 = 0,69$	$s = 0,83$

1/1 N Ä M

1.	$\bar{x} = 6,87$	$s^2 = 0,85$	$s = 0,92$
2.	$\bar{x} = 7,33$	$s^2 = 0,69$	$s = 0,83$
3.	$\bar{x} = 7,21$	$s^2 = 1,14$	$s = 1,06$
4.	$\bar{x} = 7,29$	$s^2 = 0,64$	$s = 0,80$
5.	$\bar{x} = 7,49$	$s^2 = 0,98$	$s = 0,99$
6.	$\bar{x} = 6,94$	$s^2 = 0,48$	$s = 0,69$
7.	$\bar{x} = 6,88$	$s^2 = 0,79$	$s = 0,89$
8.	$\bar{x} = 7,18$	$s^2 = 0,91$	$s = 0,95$
9.	$\bar{x} = 7,05$	$s^2 = 0,69$	$s = 0,83$
10.	$\bar{x} = 6,91$	$s^2 = 0,29$	$s = 0,53$

1/0,5 N Ä M

1.	$\bar{x} = 7,21$	$s^2 = 0,44$	$s = 0,66$
2.	$\bar{x} = 7,14$	$s^2 = 0,52$	$s = 0,72$
3.	$\bar{x} = 7,63$	$s^2 = 0,98$	$s = 0,99$
4.	$\bar{x} = 7,37$	$s^2 = 0,73$	$s = 0,85$
5.	$\bar{x} = 7,80$	$s^2 = 0,86$	$s = 0,92$
6.	$\bar{x} = 7,72$	$s^2 = 0,66$	$s = 0,81$
7.	$\bar{x} = 7,37$	$s^2 = 0,73$	$s = 0,85$
8.	$\bar{x} = 7,56$	$s^2 = 1,02$	$s = 1,01$
9.	$\bar{x} = 7,64$	$s^2 = 1,14$	$s = 1,07$
10.	$\bar{x} = 7,36$	$s^2 = 1,05$	$s = 1,02$

Bei dieser Berechnung sind Mittelwert ($\bar{x}'$) und Standardabweichung (s) charakteristische Größen einer Gauss'schen Verteilungskurve. Mit den gefundenen Werten läßt sich die Lokalisation der Mittelwerte einer Messreihe und der Schwankung der Einzelwerte um diesen Mittelwert angeben.

b) Daneben wurde der t-Test bei paarweiser Anordnung - wie bereits bei der osmotischen Resistenz angeführt - berechnet: Formel s. Seite 18.

Die Ergebnisse sind für BMHP in Tab. 11, für NÄM in Tabelle 12 wiedergegeben. (S. 26-27)

c) Zum Vergleich der Häufigkeitsverteilung bei nicht alterierten (x_1) und jeweils alterierten (x_2) Erythrozyten pro Proband wurde ein

t-Test für unverbundene Stichproben
nach folgender Formel durchgeführt:

$$t = (\bar{x}_2 - \bar{x}_1) : s_d$$

$$s_d = \sqrt{\frac{N_1 s_1^2 + N_2 s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 (S. 28) aufgeführt, wobei $\bar{x}$ den errechneten Mittelwert der nicht alterierten Erythrozyten (aus Tabelle 9 bzw. 10) wiedergibt und $\bar{x}_2$ den Mittelwert der jeweils mit den o.g. Konzentrationen von BMHP bzw. NÄM alterierten Erythrozyten.

(Siehe ebenfalls Tabelle 9 und 10).

t - Test bei paarweiser Anordnung
Berechnung für Versuche mit BMHP

<u>nicht alteriert</u> ($\bar{x}_1$)	<u>1/0,5 BMHP</u> ($\bar{x}_2$)	$d = \bar{x}_2 - \bar{x}_1$
1. 6,91	6,68	- 0,23
2. 6,84	7,00	+ 0,16
3. 6,75	6,65	- 0,10
4. 6,90	6,82	- 0,08
5. 7,00	6,88	- 0,12
6. 6,86	6,95	+ 0,09
7. 6,96	6,95	- 0,01
8. 7,03	6,98	- 0,05
9. 7,28	7,16	- 0,12
10. 6,87	7,10	+ 0,23

Ergebnis:

$t = + 0,51$

<u>nicht alteriert</u> ($\bar{x}_1$)	<u>1/1 BMHP</u> ($\bar{x}_2$)	$d = \bar{x}_2 - \bar{x}_1$
1. 6,91	6,92	+ 0,01
2. 6,84	7,50	+ 0,66
3. 6,75	6,97	+ 0,22
4. 6,90	7,11	+ 0,21
5. 7,00	7,22	+ 0,22
6. 6,86	7,25	+ 0,39
7. 6,96	6,95	- 0,01
8. 7,03	7,11	+ 0,08
9. 7,28	7,35	+ 0,07
10. 6,87	7,39	+ 0,52

Ergebnis:

$t = + 3,30$

bei $n = 10$ 1% $t > 3,355$

5% $t > 2,306$

t - Test bei paarweiser Anordnung

Berechnung für Versuche mit NÄM

<u>nicht alteriert</u>	<u>1/0,5 NÄM</u>	$d = \bar{x}_2 - \bar{x}_1$
($\bar{x}_1$)	($\bar{x}_2$)	
1. 6,94	7,21	+ 0,27
2. 6,89	7,14	+ 0,25
3. 7,10	7,63	+ 0,53
4. 6,96	7,37	+ 0,41
5. 7,18	7,80	+ 0,62
6. 7,28	7,72	+ 0,44
7. 6,87	7,37	+ 0,50
8. 7,13	7,56	+ 0,43
9. 6,83	7,64	+ 0,81
10. 7,01	7,36	+ 0,35

Ergebnis:

$t = + 11,8$

<u>nicht alteriert</u>	<u>1/1 NÄM</u>	$d = \bar{x}_2 - \bar{x}_1$
($\bar{x}_1$)	($\bar{x}_2$)	
1. 6,94	6,87	- 0,07
2. 6,89	7,33	+ 0,44
3. 7,10	7,21	+ 0,11
4. 6,96	7,29	+ 0,33
5. 7,18	7,49	+ 0,31
6. 7,28	6,94	- 0,34
7. 6,87	6,88	+ 0,01
8. 7,13	7,18	+ 0,05
9. 6,83	7,05	+ 0,22
10. 7,01	6,91	- 0,10

Ergebnis:

$t = + 1,28$

bei $n = 10$ 1% $t > 3,355$
 5% $t > 2,306$

Vergleich der Mittelwerte

1/0,5 B M H P

1. $t_1 = -3,30$.
2. $t_2 = +2,20$
3. $t_3 = -1,40$
4. $t_4 = -1,30$
5. $t_5 = -1,60$
6. $t_6 = +1,20$
7. $t_7 = -0,14$
8. $t_8 = -0,69$
9. $t_9 = -1,50$
10. $t_{10} = +2,90$.

1/1 B M H P

- $t_1 = +0,12$
- $t_2 = +7,70$.
- $t_3 = +2,90$.
- $t_4 = +3,10$.
- $t_5 = +3,20$.
- $t_6 = +4,80$.
- $t_7 = -0,13$
- $t_8 = +1,10$
- $t_9 = +0,85$
- $t_{10} = +6,50$.

1/0,5 N Ä M

1. $t_1 = +4,40$.
2. $t_2 = +3,30$.
3. $t_3 = +5,80$.
4. $t_4 = +5,40$.
5. $t_5 = +7,20$.
6. $t_6 = +5,30$.
7. $t_7 = +6,30$.
8. $t_8 = +4,70$.
9. $t_9 = +9,10$.
10. $t_{10} = +3,70$.

1/1 N Ä M

- $t_1 = -0,92$
- $t_2 = +5,50$.
- $t_3 = +1,20$
- $t_4 = +4,50$.
- $t_5 = +3,50$.
- $t_6 = -4,40$.
- $t_7 = +0,12$
- $t_8 = +0,57$
- $t_9 = +2,90$.
- $t_{10} = -1,40$

nach Documenta Geigy

bei df = 398

1% > 2,60

d) Schließlich führten wir zur weiteren Sicherung der bisher beschriebenen Ergebnisse den

Chi- Quadrat - Test

nach folgender Formel durch:

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

wobei B= Erythrozytenzahl pro Klasse und
E= Zeilensumme mal Spaltensumme dividiert
durch Gesamtsumme, wobei die Zeilen-
summe hier immer 200 beträgt.

Es ist uns damit die Möglichkeit gegeben, die Häufigkeiten einer beobachteten Verteilung mit den unter einer bestimmten Annahme theoretisch zu erwartenden Werten zu vergleichen.

Wir prüften also, ob die Gesamtheit der Unterschiede nur als rein zufällig oder als signifikant anzusehen ist.

Die erhaltenen Werte (Tabelle 14) (S. 30) werden bei $(k-1) \cdot (l-1) = 8$ Freiheitsgraden bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,001$ gesichert.

In dieser Arbeit werden also bei jedem Probanden anhand der ausgemessenen Erythrozytendurchmesser (nicht alter iert ...a l t e r i e r t mit BMHP bzw. NÄM) diese Werte $\frac{(B - E)^2}{E}$ errechnet, deren Gesamtwert uns eine Aussage über die Verteilungsform der Erythrozytengröße ermöglicht.

P R I C E - J O N E S K U R V E

Berechnung der Häufigkeitsverteilung nach χ^2

Versuche mit BMHP

1.	χ^2	=	31,67 ***
2.		=	62,50 ***
3.		=	24,80 **
4.		=	27,44 ***
5.		=	32,59 ***
6.		=	29,85 ***
7.		=	8,63 n.s.
8.		=	12,96 n.s.
9.		=	33,02 ***
10.		=	31,86 ***

Versuche mit NÄM

1.	χ^2	=	36,51 ***
2.		=	36,73 ***
3.		=	57,48 ***
4.		=	36,74 ***
5.		=	54,72 ***
6.		=	85,05 ***
7.		=	66,94 ***
8.		=	40,51 ***
9.		=	80,17 ***
10.		=	30,70 ***

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

$$df = (k - 1)(l-1) = 8$$

B= ausgezählte Erythrozyten pro entsprechender
Durchmessergruppe

$$E = \frac{\text{Zeilensumme} \cdot \text{Spaltensumme}}{\text{Gesamtsumme}}$$

$$\text{Gesamtsumme} = 600 = N$$

$$\text{Zeilensumme} = 200$$

$$P < 0,001 ***$$

Zur Erklärung sei ein Beispiel angeführt:

Es wird für jeden Probanden anhand der ausgemessenen Erythrozyten der Wert $\frac{(B - E)^2}{E}$

ausgerechnet, und zwar für jede Klasse und jede Konzentration von BMHP und NÄM.

Die Summe dieser Werte ergibt $\bar{x}^2$ pro Proband für BMHP bzw. für NÄM.

Klasse	4	5	6	7	8
$\frac{(B - E)^2}{E}$	B E	15 19	144 133	31 40,6	10 5,6
E	<u>0</u>	<u>0,84</u>	<u>0,9</u>	<u>2,2</u>	<u>3,4</u>
1/1 NÄM	5 1,68	35 19	121 133	34 40,6	5 5,6
	<u>6,5</u>	<u>5,20</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>0,06</u>
1/0,5 NÄM	0	7 19	134 133	57 40,6	2 5,6
	<u>0</u>	<u>7,50</u>	<u>0,01</u>	<u>6,6</u>	<u>2,3</u>
	5	57	399	122	17

Die Summe der errechneten Werte ergibt für diesen Probanden

$$\bar{x}^2 = \underline{\underline{36,51}}$$

III. E R G E B N I S S E

A Veränderungen der osmotischen Resistenz der Erythrozyten unter Einwirkung von verschiedenen Konzentrationen von BMHP und NÄM.

Auf Grund der beschriebenen Versuchsanordnung zur Bestimmung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten lassen sich auftretende Veränderungen nur durch einen Vergleich von n i c h t a l t e r i e r t e n Erythrozyten mit durch BMHP bzw. NÄM a l t e r i e r t e n Erythrozyten nachweisen.

Wir legten bei unseren Versuchen die Empfehlung von D A C I E (4) zugrunde, der an einem großen Kollektiv die Normalverteilung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten wie folgt ermittelte:

<u>%ige NaCl-Lösung</u>	<u>% Haemolyse</u>
0,30	97 - 100
0,35	90 - 99
0,40	50 - 95
0,45	5 - 45
0,50	0 - 6
0,55	0

Dabei wird bei gesunden Probanden die Minimalresistenz bei etwa 0,44 % NaCl und die Maximalresistenz bei etwa 0,24 % NaCl ermittelt. Die Differenz zwischen diesen beiden Bereichen bezeichnet man als D i f f e r e n z b r e i t e.

In der vorliegenden Arbeit haben wir für die statistische Berechnung 10 Probanden, für die graphische Darstellung lediglich 5 Probanden willkürlich aus unserem Untersuchungsmaterial zugrunde gelegt, um die Deutlichkeit der graphischen Darstellung zu vergrößern.

Abbildung 1, (S. 35), die als Kontrollgruppe von nicht alterierten Erythrozyten dient, zeigt die typische S-förmige Verlaufsform als Ausdruck der auftretenden Haemolyse bei den verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Die von D A C I E angegebenen Normalwerte sind mit unseren Bestimmungen im Rahmen der biologischen Schwankungsbreite identisch: Bei etwa 0,5 % NaCl ist der Haemolysebeginn zu beobachten, der nach einer normalen Resistenzbreite bei etwa 0,35 % NaCl zur Maximalresistenz führt.

In Abbildung 2 (S. 36), werden die Ergebnisse der osmotischen Resistenz der Erythrozyten nach einer stattgefundenen Alteration von 0,5 mg BMHP pro 1 ml Erythrozyten = 1/0,5 BMHP wiedergegeben. Aus der Kurventeilung wird eine im Vergleich zum Kontrollwert gleiche Resistenzbreite deutlich. Auch ist, wie Abbildung 3 zeigt, der typische steile S-förmige Kurvenverlauf unverändert erhalten. Bei dieser sehr geringen Konzentration von 1/0,5 BMHP ist ein Unterschied von Minimal- und Maximalresistenzwerten nicht zu beobachten.

Abbildung 3 (S. 37) verdeutlicht nach einer Alteration der Erythrozyten mit 1 mg BMHP pro 1 ml Erythrozyten = 1/1 BMHP nun bei höherer BMHP-Konzentration den Verlauf der Haemolyse. Bei unverändertem Kurvenverlauf, im Vergleich zur Kontrollgruppe, ist auch hier der Minimal- und Maximalresistenzwert nicht abweichend. Bei gleicher Resistenzbreite liegen lediglich die Werte der NaCl-Konzentrationen, die eine Haemolyse von etwa 30 bis 80 % bewirken, in geringerer Streubreite.

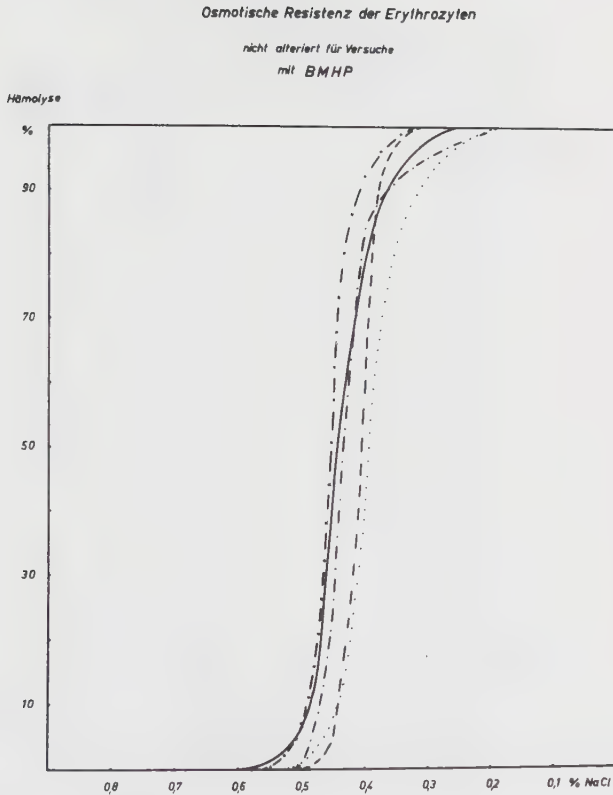


Abb. 1 Darstellung der osmotischen Resistenz der nicht alterierten Erythrozyten für Versuche mit 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP)

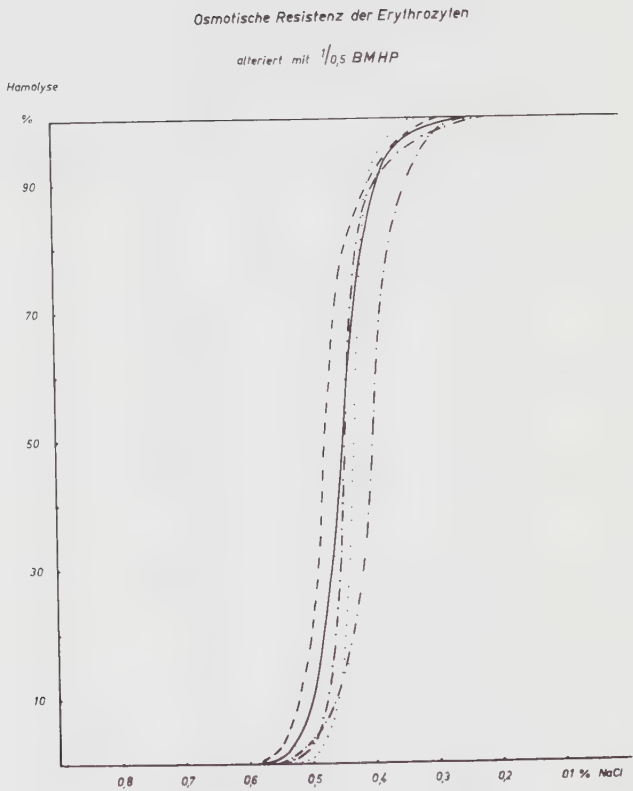


Abb. 2 Darstellung der osmotischen Resistenz der mit einer Konzentration von $\frac{1}{0,5}$ BMHP alterierten Erythrozyten

Osmotische Resistenz der Erythrozyten

alteriert mit $\frac{1}{1}$ BMHP

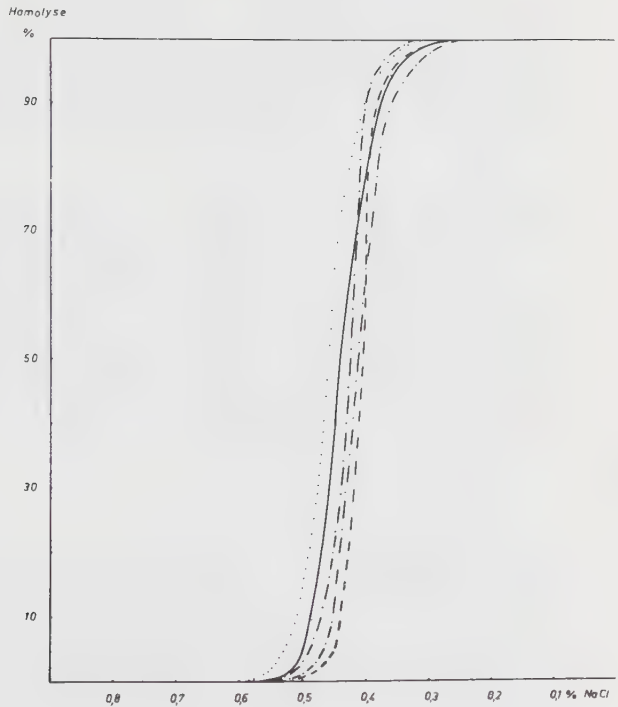


Abb. 3 Darstellung der osmotischen Resistenz der mit einer Konzentration von $\frac{1}{1}$ BMHP alterierten Erythrozyten

In Abbildung 5 und 6 sind die Werte der osmotischen Resistenz nach Alteration mit den beiden verschiedenen Konzentrationen von NÄM dargestellt. Abbildung 4 zeigt die Kontrollwerte, die zu einem Vergleich erforderlich sind. Es handelt sich hier um weitere 5 identische Probanden.

In der Kontrollgruppe - Abbildung 4 (S. 39) - fällt eine Verschiebung der Maximalresistenz bis etwa 0,2 % NaCl auf. Auch hier liegt eine, von D A C I E (4) als normal bezeichnete Minimalresistenz vor, bei gleicher Resistenzbreite.

Nach einer Alteration mit 0,5 mg NÄM pro 1 ml Erythrozyten = 1/0,5 NÄM - siehe Abbildung 5, (S.40) - kommt es zu keiner Verschiebung der Minimalresistenz im Vergleich zu dem Kontrollwert. Der NaCl-Wert der Maximalresistenz ist jetzt bei etwa 0,3 % NaCl gelegen und deutet auf eine Verschiebung gegenüber dem Kontrollwert hin. In seiner Gesamtheit ist jedoch der Kurvenverlauf unverändert.

Abbildung 6, (S.41), die die Werte nach Alteration mit 1 mg NÄM pro 1 ml Erythrozyten = 1/1 NÄM wiedergibt, lässt eine weitere Verschiebung der Maximalresistenzwerte gegenüber der Kontrollgruppe erkennen und ist bei der höheren NÄM-Konzentration mit etwa 0,375 % NaCl angegeben. Bei der gleichen Resistenzbreite ist auch hier wie bei der 1/0,5 NÄM-Konzentration der Wert der Minimalresistenz nicht verändert.

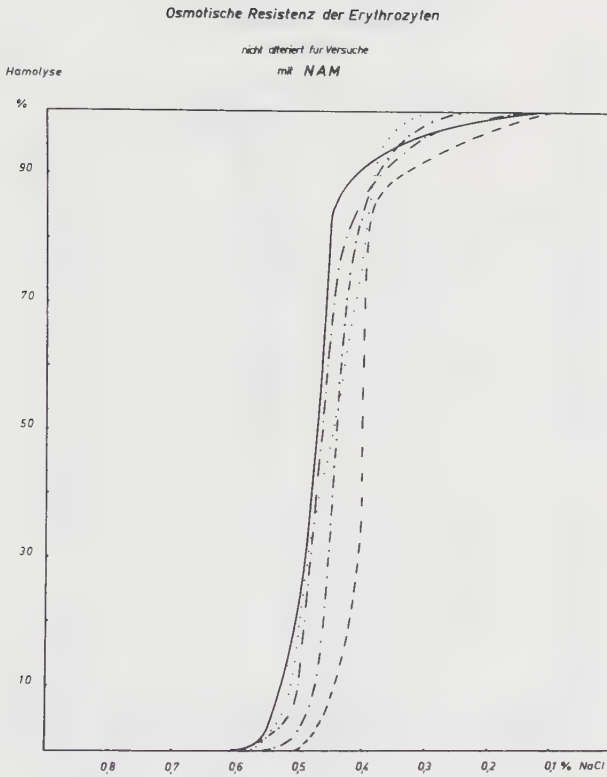


Abb. 4 Darstellung der osmotischen Resistenz der nicht alterierten Erythrozyten für Versuche mit N-Äthylmaleinsäureimid (NÄM)

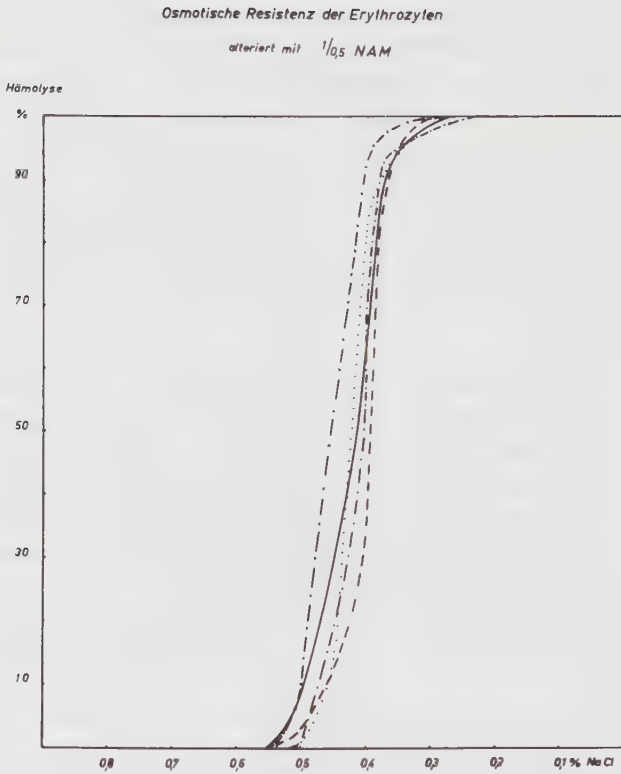


Abb.5 Darstellung der osmotischen Resistenz der mit einer Konzentration von $1/0,5$ NAM alterierten Erythrozyten

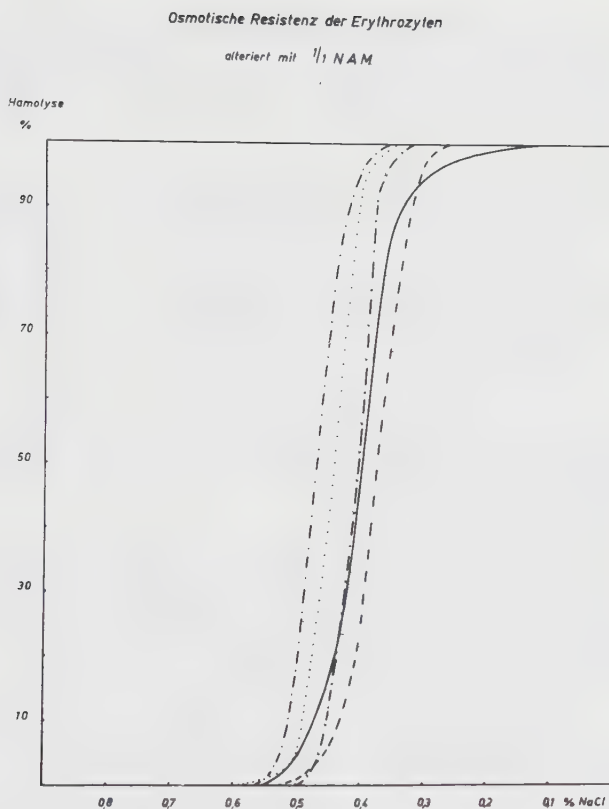


Abb.6 Darstellung der osmotischen Resistenz der
mit einer Konzentration von $\frac{1}{1}$ NAM
alterierten Erythrozyten

Die in den Abbildungen 1 bis 6 dargestellten Kurven der osmotischen Resistenz - wie sie in den vorhergehenden Seiten abgehandelt wurden - zeigen auch in den statistischen Berechnungen die gleichen Aussagen.

Es wurde, wie schon beschrieben, das Verhalten der osmotischen Resistenz der Erythrozyten auf die Alteration mit je zwei Konzentrationen von BMHP und NÄM untersucht:

1 ml Erythrozyten :	3,0 μ Mol BMHP	=	1/1 BMHP
1 ml Erythrozyten :	1,5 μ Mol BMHP	=	1/0,5 BMHP
1 ml Erythrozyten :	8,0 μ Mol NÄM	=	1/1 NÄM
1 ml Erythrozyten :	4,0 μ Mol NÄM	=	1/0,5 NÄM

Es wurde nun die Auswertung angestrebt, welche NaCl-Konzentrationen eine 25-, 50- bzw. 75%-ige Haemolyse verursachten.

Sowohl graphisch als auch rechnerisch zeigten die Erythrozyten nach Alteration mit BMHP (s.O.) keine wesentliche (signifikante) Änderung im Verhalten ihrer osmotischen Resistenz.

NÄM dagegen läßt ein anderes Verhalten der Erythrozyten erkennen:

Sowohl bei einer Konzentration von 1/0,5 NÄM als auch bei 1/1 NÄM kommt es bereits bei der Berechnung der 25-%igen Haemolyse im Vergleich zu den Kontrollwerten (= nicht alterierte Erythrozyten) zu einer signifikanten Verschiebung des Kurvenverlaufes zur hypertonen Seite.

Graphisch ist die Änderung in dieser niedrigen Hämolyse nicht so deutlich. Auch bei der 50- und 75-%igen Hämolyse-Reaktion wird, wie die Tabelle 15 (S. 44) zeigt, ein signifikanter Wert für NAM errechnet.

Osmotische Resistenz der Erythrozyten

t-Test bei paarweiser Anordnung

* Grenzwert = 2,82 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % bei 9 Freiheitsgraden.

bei 25 % Hämolyse	1/1	BMHP	t= 1,76	
bei 50 % Hämolyse	1/1	BMHP	t= 2,05	
bei 75 % Hämolyse	1/1	BMHP	t= 1,35	
bei 25 % Hämolyse	1/0,5	BMHP	t= 0,64	
bei 50 % Hämolyse	1/0,5	BMHP	t= 0,37	
bei 75 % Hämolyse	1/0,5	BMHP	t= 0,13	
bei 25 % Hämolyse	1/1	NÄM	t= 4,40	*
bei 50 % Hämolyse	1/1	NÄM	t= 5,30	*
bei 75 % Hämolyse	1/1	NÄM	t= 5,10	*
bei 25 % Hämolyse	1/0,5	NÄM	t= 4,00	*
bei 50 % Hämolyse	1/0,5	NÄM	t= 4,10	*
bei 75 % Hämolyse	1/0,5	NÄM	t= 3,50	*

Während zur statistischen Berechnung jeweils 10 Probanden pro Gruppe (alteriert bzw. nicht alteriert) berücksichtigt wurden, konnten bei der graphischen Darstellung (s. Abbildung 1 bis 6) jeweils nur 5 Versuche dargestellt werden, um die Klarheit des Bildes nicht zu gefährden.

B Ergebnisse der dargestellten Price-Jones Kurven
und ihre statistische Berechnung.

Morphologische Veränderungen, die infolge der Einwirkung chemischer Substanzen wie BMHP und NÄM auftreten, sollten durch Aufstellung der Price-Jones Kurve ermittelt werden.

Mit Hilfe eines geeichten Okularmikrometers wurden im gefärbten Blutaussstrich sowohl bei der Kontrollgruppe der nicht alterierten als auch nach Alteration mit BMHP bzw. NÄM je 200 Erythrozytendurchmesser ermittelt. Diese Werte sind in der Tabelle 7 bis 8 in unterschiedlichen Klassen aufgeführt.

Durch Aufstellen der Price-Jones Kurve gewinnt man bekanntlich einen Einblick in die Größenverhältnisse der Erythrozyten und hat damit die Möglichkeit, auf bestimmte Erkrankungen im erythropoetischen System zu schliessen.

Anhand der statistischen Verteilungskurve gibt die Breite der Kurvenbasis ein Maß für die Größe der Anisozytose, während der Gipfel der Kurve den Prozentgehalt der am häufigsten vertretenen Zellgröße aufzeigt. Daneben ist eine Verschiebung der gesamten Kurve möglich, wobei zum Beispiel eine Rechtsverschiebung eine Makro- bzw. Megalozytose verdeutlicht, während eine Linksverschiebung das Auftreten einer Mikrozytose anzeigt.

Als Durchschnittsnormalwert wurde nach umfassenden Versuchsreihen für den menschlichen Erythrozyten der Wert zwischen 7,1 bis 7,9 μ (= 7/1000 mm) festgestellt.

Die morphologischen Veränderungen an den roten Blutkörperchen nach Alteration mit BMHP und NÄM haben wir mit Hilfe der Erythrozytenverteilungskurve untersucht. Die Ergebnisse nach Auswertung der Erythrozyten der gefärbten Blutaussstriche sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengestellt. Anhand ihrer prozentualen Verteilung wurden die Price-Jones Kurven in den Abbildungen 8 bis 13 wiedergegeben. Auch hier wurde zu jeder der beiden chemischen Substanzen und Konzentrationen nur je 5 identische Probanden angeführt, um ebenfalls die Klarheit der graphischen Darstellung nicht zu beeinträchtigen. Zur späteren statistischen Berechnung wurden dann wieder alle 10 identische Probanden pro Alterationssubstanz verwandt.

Abbildung 8 zeigt als Kontrollwert nicht alterierte Erythrozyten in einer normal verteilten Price-Jones Kurve bei schmaler Basis und einem deutlichen, hier etwa 80 %igen Gipfel. Dieser Gipfel liegt in der von uns als Mittelwert bezeichneten 7,5 μ Klasse.

Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Erythrozytendurchmesser nach einer Alteration mit 0,5 mg BMHP pro 1 ml Erythrozyten = 1/0,5 BMHP. Hier wird eine nur geringe Abnahme des prozentualen Gipfels über der Normalgruppe mit 7,5 μ deutlich; jedoch ist die Basis durch Auftreten von höheren Erythrozytendurchmessern nach rechts verbreitert, im Sinne der nach chemischer Alteration zu erwartenden Sphärozytose.

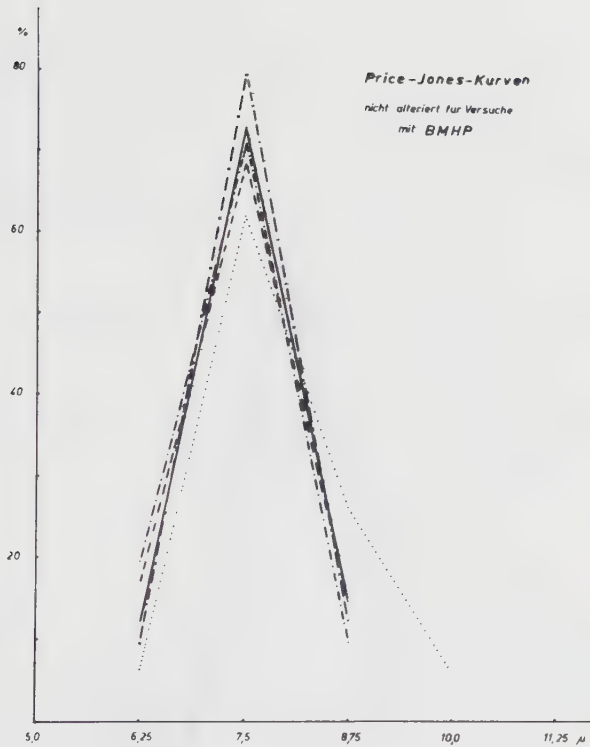


Abb.8 Darstellung der Price-Jones Kurve der nicht alterierten Erythrozyten für Versuche mit 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP)

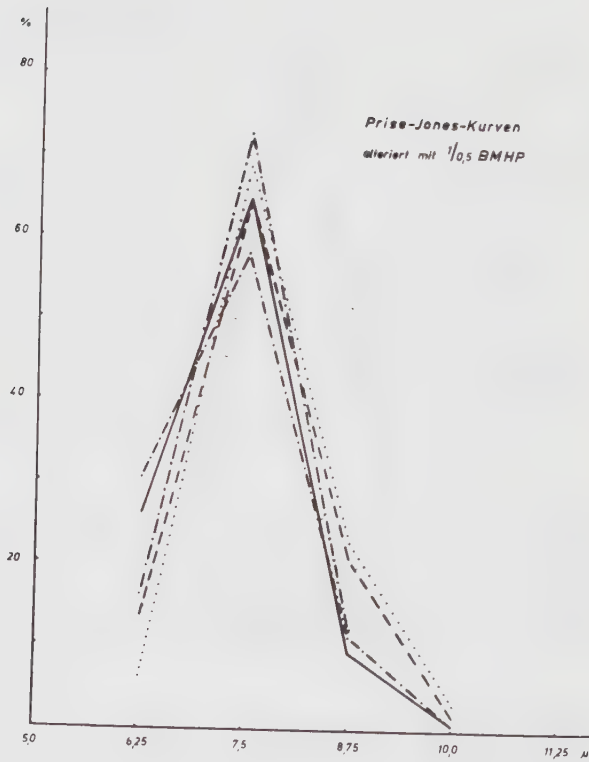


Abb.9 Darstellung der Price-Jones Kurve der
mit einer Konzentration von $1/0,5$ BMHP
alterierten Erythrozyten

In Abbildung 10, der Darstellung der Price-Jones Kurve nach Alteration mit 1 mg BMHP pro 1 ml Erythrozyten = 1/1 BMHP, tritt gegenüber Abbildung 9 eine deutlichere Abnahme des Gipfels über der 7,5 μ -Klasse ein. Sie beträgt jetzt - im Vergleich zur Kontrollgruppe - nur noch etwa 70 %. An Besonderheit ist auch hier gegenüber der Kontrollgruppe eine Basisverbreiterung nach rechts erkenntlich; dieses Ergebnis deckt sich mit den gefundenen Werten nach einer Alteration mit 1/0,5 BMHP.

Die Kontrollgruppe, die zum Vergleich mit den Erythrozytenalterationen mit NÄM eingeführt ist, - Abbildung 11 - läßt bereits eine Basisverschiebung nach rechts deutlich werden, obwohl keine ersichtlichen Versuchsänderungen gegenüber der Kontrollgruppe zu dem Versuch mit BMHP (Abbildung 8) vorhanden waren. Es wird hier aber auch ein Gipfel über der 7,5 μ -Klasse mit ca. 78 % erzielt.

Abbildung 12 stellt die Verteilungskurve nach Alteration mit 0,5 mg NÄM pro 1 ml Erythrozyten = 1/0,5 NÄM dar. Hier werden auffallende Merkmale deutlich, wie sie bisher nicht beobachtet wurden: Neben einer Abnahme des Gipfels über der 7,5 μ -Klasse kommt es zu einem relativ deutlichen Anstieg in der 8,75 μ -Klasse sowie zu einer bis 11,25 μ reichenden Basisverbreiterung nach rechts.

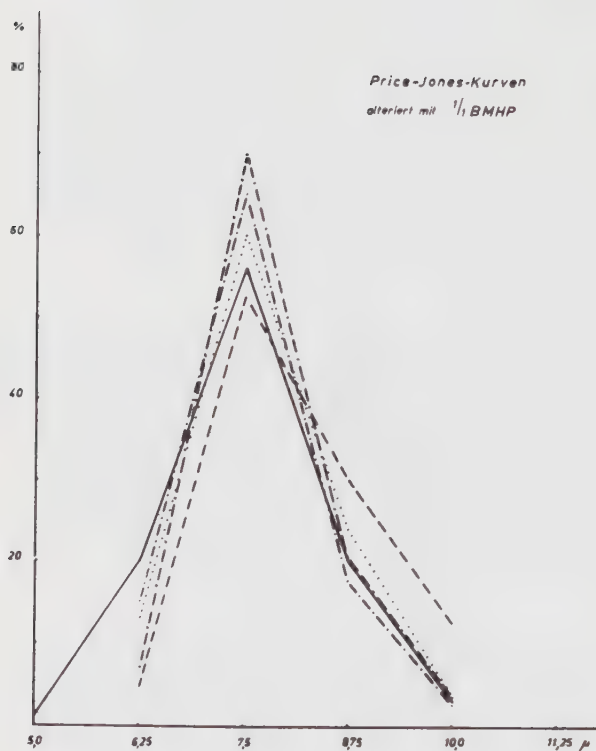


Abb.10 Darstellung der Price-Jones Kurve der
mit einer Konzentration von $1/1$ BMHP
alterierten Erythrozyten

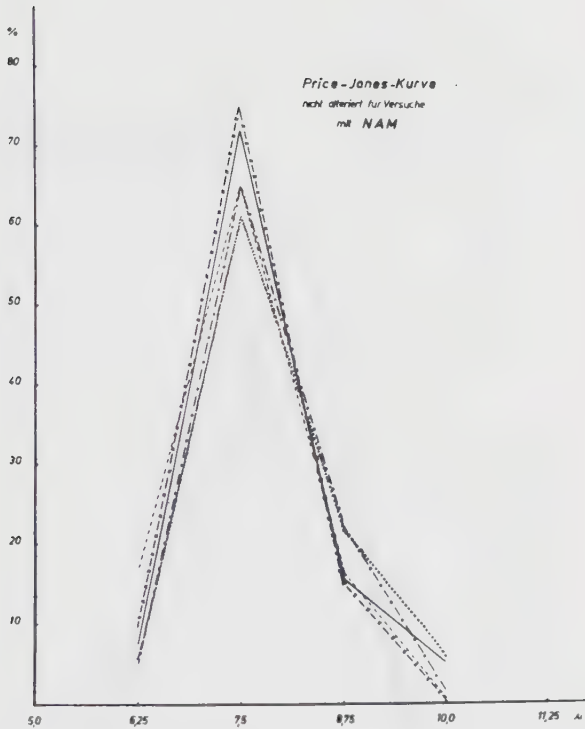


Abb.11 Darstellung der Price-Jones Kurve der nicht alterierten Erythrozyten für Versuche mit N-Äthylmaleinsäureimid (NAM)

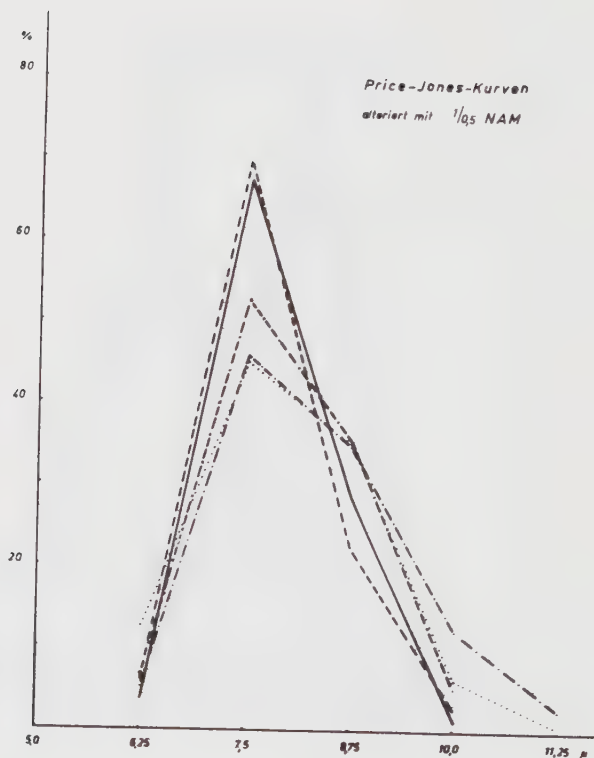


Abb.12 Darstellung der Price-Jones-Kurve der
mit einer Konzentration von $1/0,5$ NAM
alterierten Erythrozyten

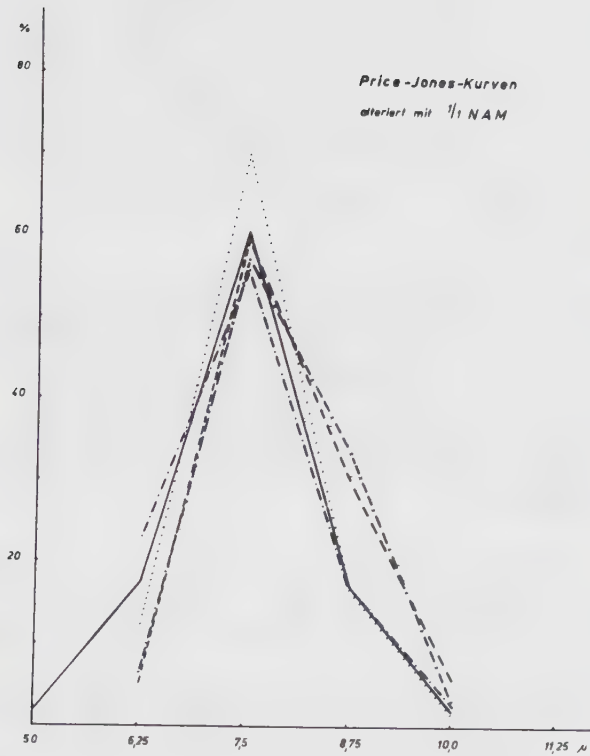


Abb.13 Darstellung der Price-Jones Kurve der
mit einer Konzentration von $\frac{1}{1}$ NAM
alterierten Erythrozyten

Abbildung 13 dagegen - die Erythrozytenverteilungskurve nach Alteration mit 1 mg NÄM pro 1 ml Erythrozyten - (bei $8,0 \mu$ Mol NÄM = $1/1$ NÄM) ähnelt der Kontrollgruppe (Abbildung 11) auch in bezug auf die beschriebene Basisverbreiterung. Jedoch kommt hier eine wesentliche Abnahme des Gipfels über der $7,5 \mu$ - Klasse zur Darstellung. Es besteht gegenüber Abbildung 11 (mit 78% fast identisch mit der 1. Kontrollgruppe = Abbildung 8) eine Abnahme auf fast 60% der ausgezählten Erythrozyten.

Wenn man diese Werte - nach Alteration mit BMHP als auch nach NÄM - vergleicht, wird besonders in der Verteilungskurve Abbildung 10, aber auch in 12 und 13 eine Veränderung gegenüber den jeweils angeführten Kontrollkurven (= nicht alterierte Erythrozyten des gleichen Probanden) ersichtlich.

Im Vergleich zu den Kontrollwerten kann - identisch zu den Abbildungen 9 und 10 sowie 12 und 13 - eine Veränderung der einzelnen Mittelwerte errechnet werden.

Es wird jedoch nicht die veränderte Aufteilung in den μ -Klassen deutlich, es ergibt sich eine Bestätigung für die Veränderung der rechnerischen Mittelwerte.

Dazu wurde für jeden Probanden die Häufigkeitsverteilung der nicht-alterierten zu den mit BMHP bzw. mit NÄM alterierten Erythrozyten verglichen, und zwar mit Hilfe des t-Testes bei unverbundenen Stichproben.

Tabelle 13 zeigt folgende Ergebnisse:

Während bei einer Alteration mit der Konzentration von 1/0,5 BMHP nur zwei Werte signifikant verändert sind, ergeben sich bei einer Konzentration von 1/1 BMHP sechs signifikant veränderte Probanden. Dagegen sind bei einer Konzentration von 1/0,5 NÄM alle zehn Probanden - Erythrozyten verändert, nach Alteration mit 1/0,5 NÄM nur fünf Probanden.

Die mit dem eben genannten Test erkenntlichen signifikanten Ergebnisse werden bei dem t-Test bei paarweiser Anordnung durch die Aussage der Differenzwerte (d_i) bestätigt.

Bei einer Konzentration von:

1/0,5	BMHP	ist	t= 0,51	nicht signifikant
1/1	BMHP		t= 3,30	gerade signifikant
1/1	NÄM		t= 1,28	nicht signifikant
1/0,5	NÄM		t= 11,80	deutl. signifikant

Der Chi-Quadrat-Test - nach der Formel

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

berechnet - (s. Tabelle 14) prüft die Veränderungen pro Person und pro chemischer Substanz, z.B.:

Kontrolle	-	1/0,5 BMHP	-	1/1 BMHP
Kontrolle	-	1/0,5 NÄM	-	1/1 NÄM

Bei diesem Test sind bei 2 Probanden die mit BMHP alterierten Erythrozyten nicht signifikant verändert.

Es wird nämlich durch diesen Test eine mögliche Änderung in der Verteilungsform, nicht der Mittelwerte der Erythrozytengröße berechnet, was nach chemischer Alteration durch die auftretende Sphärocytose auch zu erwarten ist.

Wie bei der Darstellung der Kurven der osmotischen Resistenz ist auch bei der Untersuchung der Erythrozytendurchmesserverteilungskurve in den Abbildungen die geringe Anzahl von dargestellten Probanden zu berücksichtigen, wodurch die rechnerisch signifikanten Werte nicht so klar hervortreten.

Jedoch wurde durch die Wahl der geringen Probandenzahl (je 5) eine übersichtliche bildliche Darstellung ermöglicht, da auch hier - wie aus den Tabellen zu entnehmen - die Werte sehr dicht beieinander liegen.

Die in dieser Arbeit angeführten statistischen Berechnungen wurden anhand der von Prof. Dr. ÜBERLA empfohlenen Tests durchgeführt und berechnet.

DISKUSSION

Im Rahmen der Milzdiagnostik kann man heute nicht mehr auf die Verwendung radioaktiv markierter Substanzen (9) verzichten.

Da bisher aber keine chemische Verbindung bekannt ist, die nur von der Milz selektiv angereichert wird (6) - ähnlich dem radioaktiven Jod bei der Schilddrüse - muß der Weg einer szintigraphischen Darstellung der Milz (7,8) über eine Alteration der Erythrozyten besritten werden.

In der vorliegenden Arbeit ist der Einfluß von BMHP und NAM auf die Erythrozyten zu diskutieren.

Diese beiden chemischen Substanzen sollen zu einer Alteration der Erythrozyten führen, deren Ausmaß hier mit Hilfe der osmotischen Resistenz und mit Hilfe der Price-Jones Kurven untersucht wurde.

Bei der Diagnostik von Veränderungen im erythropoetischen System ist die Untersuchung der roten Blutkörperchenresistenz gegenüber hypotonischer NaCl-Lösung von besonderer Bedeutung. Hierbei wird die Widerstandsfähigkeit der Erythrozyten gegen verschiedene chemisch-physikalische oder mechanische Einflüsse untersucht.

Aufgrund der speziellen Versuchsanordnung der vorliegenden Arbeit wurde nur Wert auf die Bestimmung der osmotischen Resistenz nach den allgemein bewährten Methoden (4) gelegt.

Zunächst wurde die Frage untersucht, welchen direkten Einfluß BMHP bzw. NÄM auf die Erythrozytenmembran besitzt und ob diese chemischen Substanzen eine Plastizitätsveränderung verursachen. (22,21,23,18).

Man könnte vermuten, daß eine direkte Schädigung der Erythrozyten durch Angriff von BMHP bzw. NÄM an den Strukturproteinen der Membran eine Permeabilitäts-erhöhung nach sich zieht.

S H E E T S und Mitarbeiter (26) bewiesen mit PCMB (= p-chloromercuribenzoat), daß diese Substanz auf Grund der positiven Ladung die Erythrozytenmembran nur langsam zu passieren vermag. Erst bei höheren Konzentrationen war nach vorangegangener Permeabilitätserhöhung eine stärkere Penetration in die Zelle möglich und führte zu einer vollständigen Hämolyse.

Diese Reaktion untersucht von S H E E T S und Mitarbeiter (26) verdeutlicht, daß BMHP im Gegensatz zu der früher synthetisierten Substanz **p**-Chloromercuribenzoat (PCMB) in der Lage ist, die Zellmembran des Erythrozyten rasch zu penetrieren.

Dieses Penetrationsvermögen versucht man einmal aufgrund der sterischen Konfiguration von BMHP zu erklären, zum anderen deutet der rasche Abfall der Glutathionsreserve im Erythrozyten auf die Einwirkung von BMHP hin (34). Zugleich geht aus diesen Untersuchungen hervor, daß PCMB nicht fähig ist, die nicht geschädigte Zellmembran zu passieren.

J A K O B und J A N D L (10) deuten den Einfluß von BMHP auf den Erythrozyt als Ausdruck einer Zellschädigung, wonach diese organische Hg- Verbindung zu einem K^+ - Ionen-Ausstrom, Na^+ - Ionen-Einstrom und (damit) zu einer Sphärozytose führt.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden durch BMHP bzw. NÄM Erythrozytenalterationen nicht nur alleine durch Verschiebungen der elektrischen Membranladung hervorgerufen, sondern im gleichen Maße werden Störungen der intraerythrozytär gelegenen Enzyme (34) für die Sphärozytose verantwortlich gemacht. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine größere Affinität des BMHP bzw. NÄM zu den Sulfhydrylgruppen der hochmolekularen Eiweißkörpern (wie Hämoglobin, Enzyme etc.) besteht als zu den in der Membran vorhandenen Proteinen.

Infolge der beschriebenen Fähigkeit von BMHP bzw. NÄM, fast ungehindert aufgrund der bestehenden großen Affinität auch in geringen Konzentrationen die Membran zu durchdringen, kommt es zunächst intrazellulär zu einer Blockierung der dort gelegenen Enzyme. Die daraus resultierenden Stoffwechselstörungen verursachen danach erst die zu beobachtende Hämolyse. Dies ergibt sich aus den Untersuchungen von Z E I G E R (34), der schon bei geringen BMHP- bzw. NÄM-Konzentrationen unter anderem eine massive Glutathion-Reductase-Hemmung nachweisen konnte.

Unter der Einwirkung der chemischen Substanz NÄM ergeben sich Hinweise, daß weniger eine Permeabilitätsänderung für bestimmte Elektrolyte und Nicht-Elektrolyte bedeutsam ist, sondern daß der Verlust der Viscoelastizität der Zellmembran eine signifikante Änderung der osmotischen Resistenz nach sich zieht (10). Dies umso mehr, wenn man bedenkt, daß es unter dem Einfluß von NÄM zu einer Eiweißdenaturierung im Bereich der Zellmembran kommen muß.

Durch Veränderung jener Strukturproteine erfolgt ein rasches Permeieren von NÄM in die Zelle und führt nach Blockierung der verschiedenen Enzyme zu einer Aufhebung der Stoffwechselfunktionen.

Bei der Auswertung unserer Ergebnisse fanden wir selbst bei geringen NÄM-Konzentrationen eine Abnahme der osmotischen Resistenz, die von uns durch statistische Berechnungen gesichert wurde.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Einwirkung von BMHP und NÄM unterschiedliche, konzentrationsabhängige Reaktionen an der Erythrozytenmembran hervorrufen. Offensichtlich scheint ein direkter Einfluß bei den von uns verwandten BMHP-Konzentrationen weder auf die elektrische Ladung noch auf die Eiweißstrukturen zu bestehen.

Demgegenüber konnten wir eine signifikante Änderung der osmotischen Resistenz unter der Einwirkung von NÄM beobachten. Hervorzuheben ist hierbei, daß die hämolytischen Erscheinungen, die wir als Ausdruck der Änderung der Permeabilität der Erythrozytenmembran ansahen, schon bei geringen Konzentrationen auftraten.

Um den Aussagewert unserer Untersuchungen von Erythrozyten unter der Einwirkung von BMHP und NÄM zu vervollständigen, haben wir mit Hilfe der Price-Jones Kurve versucht, morphologische Veränderungen an den einzelnen Erythrozyten nach der Alteration zu erfassen.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß BMHP und NÄM sowohl die Zellmembran als auch intrazelluläre Stoffwechselvorgänge verändern (21,22), wäre zu fordern, daß die geschädigten Erythrozyten hinsichtlich ihrer Durchmesser von der Normalverteilung der Price-Jones Kurve abweichen.

Bei Versuchen mit Wärmealteration von Erythrozyten (27, 28) fand man eine Aufsplitterung der Price-Jones Kurve in zwei Komponenten, hervorgerufen durch stark unterschiedliche Partikelgrößen. Einmal wurden Sphärozyten mit einem Durchmesser von ca. 6 μ ermittelt, während die zweite Komponente Erythrozytenfragmenten zuzuordnen war, deren Durchmesser weniger als 3 μ betrug.

Eine Bestätigung dieser zytometrischen Aussagen erbrachten die histologischen Untersuchungen, als man Sphärozyten im perisinusalen retikulären Maschenwerk der roten Milzpulpa sequestriert vorfand. Die Erythrozytenfragmente jedoch, die infolge ihrer kleineren Durchmesser die Poren der Milzsinus zu durchwandern vermochten, wurden im RES phagozytiert.

Wir haben die Frage untersucht, in wie weit es auch unter dem Einfluß von BMHP und NÄM zum Auftreten dieser Erythrozytenfragmente kommt.

Mit Hilfe der Price-Jones Kurve konnten wir zeigen, daß die verschiedenen Konzentrationen von BMHP und NÄM nicht zum Auftreten von Erythrozytenfragmenten führen. Die Erythrozytendurchmesser lagen nie unter 5 μ .

Ähnlich, wie wir bereits durch die Auswertung der osmotischen Resistenz nachweisen konnten, daß ein signifikanter Einfluß von BMHP auf den Erythrozyten konzentrationsabhängig ist, fanden wir bei der Auswertung der Erythrozytendurchmesser folgende Kriterien:

Die 1/0,5 BMHP-Konzentration erbrachte keine signifikante Abweichung von der normalen Erythrozytenverteilungskurve. Bei der höheren Konzentration von 1/1 BMHP dagegen war die Einwirkung durch statistische Berechnung signifikant verändert nachweisbar.

Diese Größenzunahme, die zugleich den Beginn der einsetzenden Zellschädigung am Erythrozyten verdeutlicht, ist hervorgerufen durch die am Erythrozyten sich abspielende Ladungsänderung. Durch K^+ -Ionen-Ausstrom aus der Zelle und dem damit verbundenen Na^+ -Ionen-Einstrom und Wassereinstrom wird eine Sphärozytose hervorgerufen. Bei der niedrigeren BMHP-Konzentration 1/0,5 bleibt offenbar eine messbare Schädigung der Zellmembran aus.

Aus unseren Beobachtungen ergibt sich, daß durch BMHP eine Permeabilitätserhöhung hervorgerufen wird, und die chemische Substanz dann ungehindert durch die Membran in die Zelle penetrieren kann.

Z E I G E R (34) konnte nachweisen, daß nur ein geringer Unterschied hinsichtlich der Einwirkung von BMHP auf reduziertes Glutathion sowohl bei nicht alterierten als auch bei hämolysierten Erythrozyten vorlag.

Weshalb BMHP bei niedriger Konzentration keinen meßbaren Einfluß auf den Erythrozyten hervorruft, ist damit zu begründen, daß der pH-Wert des BMHP durch den Ausstrom der K^+ -Ionen mehr zur alkalischen Seite verschoben wird. Dadurch kommt es zu einem Ausfall der Quecksilber-Ionen, die sich in Form kleiner Molekülaggregate an der Erythrozytenmembran niederschlagen. Dieser Vorgang wird noch durch die pufferende Eigenschaften der Membranproteine unterstützt.

Aus dem Gesagten resultiert, daß BMHP erst in wesentlich höherer Konzentration über eine Blockierung intraerythrozytär gelegener Enzyme und der damit verbundenen Hemmung des Zellstoffwechsels unter gleichzeitiger Abnahme des Adenosin-Triphosphats (ATP) eine Sphärozytose solchen Ausmaßes auslöst, die schließlich zu einer vollständigen Hämolyse führt. (32).

Wir konnten durch statistische Berechnungen den Beweis einer beginnenden Größenzunahme nach Alteration mit 1/1 BMHP am einzelnen Erythrozyten nachweisen. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den von uns im Rahmen der osmotischen Resistenz untersuchten Erythrozyten, wobei ebenfalls - wenn auch nicht signifikant - eine im Anfangsstadium sich befindende Hämolyseänderung vorlag.

Bei der Untersuchung der Erythrozytenverteilungskurve nach Alteration mit verschiedenen Konzentrationen von NÄM fanden wir voneinander abweichende Ergebnisse:

Während bei Alteration mit 1/0,5 NÄM eine signifikante Sphärozytose eintrat, war bei der höheren Konzentration von 1/1 NÄM dieses Phänomen nicht statistisch zu sichern.

Wenn wir annehmen, daß NÄM eine selektive Schädigung der Erythrozytenmembran hervorruft (11, 21) - durch Eiweißdenaturierung und der damit verbundenen Aufhebung der Viscoelastizität - so ist die geringere Wirkung von 1/1 NÄM mit den zur Zeit bekannten Überlegungen nicht in Einklang zu bringen. Es muß hier jedoch hervorgehoben werden, daß NÄM unabhängig von der verwandten Konzentration sehr viel leichter als BMHP die Zellmembran zu durchdringen vermag.

Bei der Konzentration 1/0,5 NÄM kommt es möglicherweise mehr durch die Schädigung der Zellmembran zu einer Sphärozytose, wohingegen bei höheren Konzentrationen (1/1 NÄM) die Einwirkung des NÄM intraerythrozytär auf Enzyme und die damit verbundenen Stoffwechselblockierung eine Zellschädigung auslöst und möglicherweise eine nachfolgende Sphärozytose zu verhindern im Stande ist. (26).

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurden Alterationen von Erythrozyten durch Beladung mit 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP) und mit N-Äthylmaleinsäureimid (NÄM), zwei SH-Inhibitoren, vorgenommen und deren Auswirkungen sowohl auf die osmotische Resistenz der Erythrozyten als auch auf morphologische Veränderungen mit der Price-Jones Kurve bei folgenden Konzentrationen untersucht:

1/1 BMHP = 1ml Erythrozyten+ 1mg BMHP (3,0 μ Mol BMHP)

1/0,5BMHP= 1ml Erythrozyten+ 0,5 mg BMHP (1,5 μ " ")

1/1 NÄM = 1 ml Erythrozyten+ 1mg NÄM (8,0 u " ")

1/0,5 NÄM= 1 ml Erythrozyten+ 0,5 mg NÄM (4,0 μ " ")

Nach chemischer Alteration mit BMHP kam es unter Einwirkung der o.g. Konzentrationen bei der Bestimmung der osmotischen Resistenz zu keiner signifikanten Verschiebung zur hypertonen Seite

Nach Alteration mit NÄM dagegen fand sich eine A b w e i c h u n g der osmotischen Resistenzkurve zur hypertonen Seite, d.h. die osmotische Resistenz der mit NÄM-alterierten Erythrozyten erwies sich als vermindert, es kam somit über das Stadium der Sphärozytose zur Hämolyse.

Die Bestimmung der morphologisch fassbaren Veränderungen der Erythrozyten nach Alteration mit BMHP und NÄM - nachgewiesen mit Hilfe der Abweichung von der Price-Jones Kurve, als der normalen Erythrozyten-

verteilungskurve - ergab folgende Ergebnisse:

BMHP-Alteration führte zu einer Makrozytose, die in ihrer Intensität direkt proportional war den verschieden angewandten Konzentrationsstufen. Ursache dieser beobachteten Makrozytose ist begründet in einer Schädigung der Zellmembran, wodurch Störungen der biophysikalischen Eigenschaften der Erythrozyten hervorgerufen werden.

Umgekehrt proportional dagegen verhielt sich das Auftreten von Makrozytose und Anisozytose unter der Einwirkung von den verwandten NÄM-Konzentrationen. Dies besagt, daß NÄM aufgrund der chemischen Konfiguration des Moleküls ein besseres Penetrationsvermögen durch die Erythrozytenmembran besitzt, und somit nach vorausgegangener Sulfhydrylinhibition und Eiweißdenaturisierung sekundär zu einer Zellschädigung bzw. Sphärozytose führt.

L i t e r a t u r

=====

1. ALLEN, D.W. und J.H. JANDL:
Oxydative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action.
J. Clin. Invest. 40 (1961), 454
2. BEUTLER, E.:
The glutathione instability of drug-sensitive red cells: A new method for the in vitro detection of drug sensitivity.
J. Labrat. Clin. Med. 49 (1957), 84
3. BEYER, J.:
Untersuchungen über die Auswirkung der Wärme-Alteration von Erythrozyten auf die osmotische Resistenz und die Erythrozytenmorphologie.
Med. Diss., Mainz (in Vorbereitung)
4. DACIE, J.V.:
The Haemolytic Anaemias, congenital and acquired
Congenital Anaemias - Part I
The Haemolytic Anaemias- Part II
London 1962
5. DOCUMENTA GEIGY
Wiss. Tabellen, 6. Aufl., Basel 1960
6. FISCHER, J.:
Die Milzszintigraphie.
Radiologe 5. (1965), 372
7. FISCHER, J.:
Die Anwendung von radioaktivem Chrom (⁵¹Cr) zur Bestimmung der Erythrozytenlebensdauer, Erythrozytensequestration und Szintigraphie der Milz.
Habil.-Schrift, Mainz 1963 (Manuskript)

8. FISCHER, J., MUNDSCHEK und WOLF :
Milzszintigraphie mit 1-Bromomercuri-(¹⁹⁷Hg)-
hydroxypropan (BMHP).
Nucl.-Med. (Stuttg.) 103 (1965), 349

9. GRAY, S.J. und KSTERLING :
The tagging of red cells and plasma proteins
with radioactive chromium.
J. Clin. Invest. 29 (1950), 1604

10. JACOB, H.S. und J.H. JANDL:
Effects of sulfhydryl inhibition on red blood
cells.
I. Mechanism of hemolysis.
J. Clin. Invest. 41 (1962), 479

11. JACOB, H.S. und J.H. JANDL:
Effects of sulfhydryl inhibition on red blood
cells.
II. Studies in vivo
J. Clin. Invest. 41 (1962), 1514

12. JANDL, J.H., R.L. SIMMONS und W.B. CASTLE:
Red cell filtration and the pathogenesis
of certain hemolytic anemias.
Blood 18 (1961), 133

13. JUNG, F.:
Das Schicksal toxisch veränderter roter Blut-
zellen in der Milz.
Klin. Wschr. 36 (1958), 63

14. JOHNSON, Ph.M., J.C. HERION und S.L. MOORING:
Scintillation scanning of the normal human
spleen utilizing sensitized radioactive
erythrocytes.
Radiology 74 (1960), 99

15. KESSLER, R.H., R. LOZANO und R.F.PITTS:
Studies on structure diuretic activity relation -
ships of organic compounds of mercury.
J. Clin. Invest. 36 (1957), 656
16. KOLLER, S.:
Statistische Auswertungsmethoden in:
Biochemisches Taschenbuch
Hrsg. v. Rauen.
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964,
17. LINDER, S.:
Statistische Methoden für Naturwissenschaftler,
Mediziner und Ingenieure.
Basel 1964
18. MASON-GUEST, M., T.P. BOND, R.G.COOPER und J.R.DERRICK:
Red blood cells: change in shape in capillaries.
Science 142 (1963), 1319
19. NICOLAU, C.T., P. TEITEL und M. FOTINO:
Loss of filtrability of erythrocytes coated
with incomplete antibodies.
Nature 184 (1959), 1808
20. NICOLAU, C.T., P. TEITEL und M.FOTINO:
The erythrocytes filterability test.
in: VIII th Congress of the Internat. Soc. Haemat.,
Tokyo, Sept. 1960
21. RAND, R.P. :
Mechanical properties of the red cell membrane.
II. Viscoelastic breakdown of the membrane.
Biophys. J. 4 (1964), 303
22. RAND, R.P. und A.C. BURTON:
Mechanical properties of the red cell membrane.
I. Membrane stiffness and intracellular pressure.
Biophys. J. 4 (1964), 115

23. RIFKIND, R.A.:
Destruction of injured red cells in vivo.
Amer. J. Med. 41 (1966), 711

24. SAND, J. und K.A. HOFMANN:
Einwirkung von Propylen und Butylen auf Mercuri-
salze.
Verb. Dtsch. Chem. Ges. 33 (1900), 1353

25. SMYTH, D.G., A. NAGAMATSU und J.S. FRUTON:
Some reactions of N-ethylmaleimide.
J. Amer. chem. Soc. 82 (1960), 4601

26. SHEETS, R.F., H.E. HAMILTON, E.L. DeGOWIN und R.L.KING:
Failure of N-ethylmaleimide to react with
sulfhydryl groups of intact human erythrocytes.
J. Appl. Physiol., Wash. 9 (1956), 145

27. SCHUBOTHE, H.:
Studien zur thermischen Formveränderung und
thermischen Hämolyse von roten Blutkörperchen.
Folia haemat. (Lpz .) 77 (1960), 156

28. SCHUBOTHE, H. und F. GROSS:
Wärmeveränderungen roter Blutkörperchen.
Schweiz. med. Wschr. 83 (1953), 1048

29. TEITEL, P. und C.T. NICOLAU:
The correlation between the plasticity and
the life span of red blood cells.
Rev. roumaine Méd. interne 1 (1964), 223

30. WAGNER jr. H.N., J.G. McAfee:
The use of Hg ²⁰³ labeled bromomercuri-
hydroxypropane (BMHP) in radioisotope
scanning of the spleen.
J. nucl. Med. 4 (1963), 190

31. WAGNER jr. H.N.:
Removal of Erythrocytes from the Circulation.
Arch. Int. Med., Baltimore, 110 (1962), 128
32. WILBRANDT, W.:
Osmotische Natur sogenannter nicht-osmotischer
Hämolysen (Kolloidosmotische Hämolysen).
Pflügers Arch. ges. Physiol. 245 (1941), 22
33. WINKELMAN, J.W., H.N. WAGNER, jr., J.G. McAFEE
und J.M. MOZLEY:
Visualization of the spleen in man by radioiso-
tope scanning.
Radiology 75 (1960), 465
34. ZEIGER, K.Th.:
Untersuchungen über Veränderungen im Erythrozyten-
stoffwechsel nach Einwirkung von i-Bromomercuri-2-
hydroxypropan (BMHP) und N-Äthylmaleinsäureimid
(NÄM).
Med. Diss., Mainz 1967

Lebenslauf

Am 24. März 1940 wurde ich als zweites Kind des praktischen Arztes Dr. Wilhelm Tussing und seiner Ehefrau Irma, geb. Schlapper in Neuruppin/Mark Brandenburg geboren.

Nach der Flucht von dort im Jahre 1945 ließ sich mein Vater als praktischer Arzt in Kempen/Niederrhein nieder. In Kempen besuchte ich von 1946 bis 1950 die Volksschule. Anschließend wurde ich in das Gymnasium Thomaeum in Kempen eingeschult. Mit der Reifeprüfung im Februar 1960 beendete ich meine Schulzeit.

Nach dem Krankenpflagedienst studierte ich ab dem Sommersemester 1960 in Köln Medizin. 1962 wechselte ich die Universität und ging nach Mainz.

Nach der ärztlichen Vorprüfung, die ich im Oktober 1963 an der Johannes Gutenberg Universität bestand, legte ich im Januar 1967 auch das Medizinische Staatsexamen in Mainz ab. Die Medizinalassistentenzeit absolvierte ich im Stadtkrankenhaus Rüsselsheim (Chirurgie und Innere Medizin) sowie an der Univ.-Frauenklinik in Gießen. Nach einjähriger Assistententätigkeit im Hessen-Sanatorium der L.V.A.-Hessen in Bad Nauheim bin ich nun im Rahmen einer vorwiegend kardiologischen Ausbildung an der W.G. Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim angestellt.

1. 1. 1967

Für die Überlassung des Themas und die freundliche
Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung
danke ich Herrn Prof.Dr.J. Fischer sehr herzlich.

